



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada

**OPTIMIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE
VARIEDADES ECUATORIANAS DE ARROZ
INTEGRAL PARA LA OBTENCIÓN DE
ALIMENTOS CON ALTO VALOR NUTRITIVO
Y FUNCIONAL**

MEMORIA PRESENTADA POR:

PATRICIO JAVIER CACERES COSTALES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

DOCTOR

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. JUANA FRÍAS AREVALILLO

Dra. CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA

Dra. LOURDES AMIGO GARRIDO



MADRID, 2015



JUANA FRIAS AREVALILLO, INVESTIGADORA CIENTÍFICA, CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA, CIENTÍFICA TITULAR, PERTENECIENTES AL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, Y LOURDES AMIGO GARRIDO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN PERTENECIENTE AL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo titulado **“Optimización de la germinación de variedades ecuatorianas de arroz integral para la obtención de alimentos con alto valor nutritivo y funcional”** ha sido realizado por el Ingeniero D. Patricio Javier Cáceres Costales bajo nuestra dirección en el Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid, 3 Junio de 2015

Dra. Juana Frías Arevalillo

Dra. Cristina Martínez Villaluenga

Dra. Lourdes Amigo Garrido



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Visto Bueno: TUTORA

Dra. María Angeles Martín Cabrejas
Profesor Titular de Universidad
Departamento de Química Agrícola y Bromatología
Universidad Autónoma de Madrid

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca doctoral de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) del gobierno de la República del Ecuador.

Los estudios realizados en esta Memoria han sido financiados por el proyecto de investigación AGL2010-16310 titulado “Procesos tecnológicos para la obtención de extractos funcionales de leguminosas con actividad antihipertensiva” del Ministerio de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Economía y Competitividad (2010-2014).

APORTACIONES CIENTÍFICAS

Aportaciones Científicas

La presente Memoria ha dado lugar a las siguientes aportaciones:

Solicitud de patente

1. Patente: Procedimiento de obtención de granos de arroz integral germinado y productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos. Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga, Patricio J. Cáceres, Elena Peñas, Lourdes Amigo, Número de solicitud: P201430115. 30 Enero 2014.

Publicaciones Científicas incluidas en el Journal Citation Report del Institute for Scientific Information (ISI)

1. Cáceres, P., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. (2014). Assessment on Proximate Composition, Dietary Fiber, Phytic Acid and Protein Hydrolysis of Germinated Ecuadorian Brown Rice. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69: 261-267.
2. Cáceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. (2014). Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*, 152: 407-414.
3. Cornejo, F., Cáceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Rosell, C. M., Frias, J. (2015). Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of brown rice breads. *Food Chemistry*, 173: 298-304.

Presentación a congresos y resúmenes publicados

1. Cáceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. Optimisation of germination temperature and time to improve gamma aminobutyric acid, polyphenols and antioxidant activity in brown rice. Euro Food Chem XVII, 2013, Estambul (Turquía).
2. Cáceres, P. J., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. Sun-drying enhances the accumulation of bioactive compounds of germinated brown rice. Euro Food Chem XVIII, 2015, Madrid (España).

ÍNDICE

INDICE

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción	5
2.1	Producción de arroz.....	6
2.2	Estructura del grano de arroz y distribución de su composición nutricional.	11
2.3	Composición nutricional y fitoquímicos del arroz integral y sus efectos saludables.....	12
2.3.1.	Hidratos de carbono.....	14
2.3.2.	Proteínas	17
2.3.3.	Lípidos	20
2.3.4.	Elementos minerales	22
2.3.5.	Vitaminas	22
2.3.6.	Fitatos	23
2.3.7.	Ácido γ -aminobutírico.....	24
2.3.8.	γ -orizanol.....	25
2.3.9.	Compuestos fenólicos.....	26
2.3.10.	Otros componentes con efectos saludables	28
2.4.	Consumo de arroz y nuevas tendencias.....	28
2.5.	Biofortificación del arroz integral mediante la germinación	30
2.6.	Beneficios saludables del arroz integral pre-germinado y germinado.....	33
2.7.	Desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales derivados del arroz integral germinado	37
3.	Interés y Objetivos	41
4.	Resultados	45
4.1.	Efecto de las condiciones de germinación en el valor nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de distintas variedades de arroz integral	45
	Publicación I. Evaluación sobre la composición proximal, fibra alimentaria, ácido fítico y la hidrólisis proteica del arroz integral ecuatoriano germinado.	48

Publicación II. Maximización del contenido de fitoquímicos y de la actividad antioxidante de los brotes de arroz integral ecuatoriano a través de la optimización de las condiciones de germinación.	56
Patente: Procedimiento de obtención de granos de arroz integral germinado y productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos.....	65
4.2. Utilización de arroz integral germinado en la elaboración de panes para personas con necesidades nutricionales especiales.	87
Publicacion III. Efecto de la germinación en el valor nutritivo y los compuestos bioactivos de pan de arroz integral.	89
5. Discusión general.....	99
5.1. Efecto de las condiciones de germinación en el valor nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de distintas variedades de arroz integral germinado.....	100
5.2 Utilización de arroz integral germinado en la elaboración de panes para personas con necesidades nutricionales especiales.	110
6. Conclusiones	119
7. Bibliografía	123

RESUMEN

1. Resumen

El arroz está considerado como la base de la alimentación de más de dos tercios de la población mundial, cuyo consumo se realiza principalmente como arroz blanco obtenido después de quitarle el salvado y el germen en el proceso de pulido. El alto aporte calórico de dietas basadas en un elevado consumo de arroz blanco ha sido identificado como un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y obesidad. La promoción de dietas saludables que incluyan cereales integrales es una de las estrategias utilizadas para frenar la incidencia de estas patologías. Numerosos trabajos científicos han puesto de manifiesto que el consumo de arroz integral reduce el riesgo de padecer enfermedades degenerativas ya que, al incluir el salvado y el germen, proporciona fibra alimentaria y fitoquímicos o nutraceuticos, además de aportar mayor poder nutritivo. Sin embargo, este tipo de arroz no es atractivo al carecer de la textura y de las características sensoriales demandadas por el consumidor, a la vez que necesita largos tiempos de cocción. La germinación se presenta como un proceso natural, económico y sostenible que conlleva profundas transformaciones bioquímicas y potencia las propiedades del arroz integral, mejora la palatabilidad y su composición nutricional y funcional.

La presente Tesis propone obtener germinados de arroz integral procedentes de distintas variedades ecuatorianas y caracterizarlos desde el punto de vista de su composición nutritiva y en nutraceuticos con el fin de elaborar pan integral con valor nutritivo y características funcionales mejoradas que, incluso, pueda ser destinado a un amplio grupo de población como son los intolerantes al gluten.

En esta memoria se han caracterizado distintas variedades de arroz integral ecuatoriano crudo, pre-germinado a 28°C durante 24 h y posteriormente germinado a 28 y 34°C durante 48 y 96 h, desde el punto de su composición proximal, fibra alimentaria, ácido fítico, parámetros de digestión proteica y del almidón y se ha puesto de manifiesto que el arroz integral germinado puede contribuir a las necesidades nutricionales y aportar compuestos bioactivos saludables a una amplia población mundial que sustituya al arroz blanco como alimento básico.

Con el fin de maximizar el contenido en nutraceuticos durante la germinación de

arroz integral, se llevó a cabo un modelo de superficie-respuesta y se observó que la actividad antioxidante fue superior en el cultivar Go39839, mientras que la variedad INIAP15 acumuló la mayor cantidad de GABA y de compuestos fenólicos totales en las condiciones óptimas de germinación. A su vez, se encontró que la utilización de luz continuada durante la germinación conlleva mayor acumulación de GABA y γ -orizanol, sugiriendo su aplicación para obtener alimentos y derivados alimenticios y no alimenticios con un alto contenido en estos compuestos bioactivos saludables.

Los panes sin gluten elaborados con harinas de arroz integral de la variedad INIAP15 pre-germinado durante 24 h y germinado durante 12, 24 y 48 h a 28 °C con propiedades tecnofuncionales previas aceptables presentaron una calidad nutricional superior y mayor contenido de GABA, compuestos polifenoles totales y actividad antioxidante, y menores niveles de ácido fólico y de índice glucémico que los panes elaborados con el mismo arroz sin germinar.

En conjunto, la germinación del arroz integral se propone como un proceso efectivo para mejorar la calidad nutricional y funcional de un alimento básico ampliamente consumido en todo mundo que puede contribuir a paliar, no sólo la malnutrición, sino a frenar la aparición de enfermedades degenerativas de notable prevalencia en nuestra sociedad. Los germinados de arroz integral pueden ser consumidos directamente como un alimento saludable o se puede utilizar en forma de harinas para la elaboración de pan integral muy demandado por nuestra sociedad que, incluso, puede formar parte de la dieta de una población con necesidades nutricionales especiales, como los celíacos.

INTRODUCCION

2. Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el alimento básico para más de dos tercios de la población mundial y su cultivo es el más extendido entre los cereales (9% de la superficie total cultivada). La tradición del consumo de arroz comenzó en el Continente Asiático, donde se domesticó hace más de 5.000 años (Molina y col., 2011; Nayar, 2014). En Europa se introdujo con las invasiones de pueblos de Oriente Medio y a América llegó posteriormente, con los primeros colonizadores e inmigrantes europeos, donde se adaptó y compartió importancia con el maíz y el trigo (Dendy y Dobraszczyk, 2004; CEI-RD, 2011).

La planta de arroz es una planta herbácea semiacuática que puede alcanzar una altura desde los 50 cm hasta los 5 m. Cada planta puede contener de 15 a 40 panículas, donde se encuentran unos 140 granos de arroz que en su desarrollo final presentan una humedad promedio del 30%. El arroz es un cereal perteneciente al orden *Poales*, familia *Poaceae* (también conocida como *Gramineae*), y género *Oryza*. A este género botánico pertenecen 22 especies salvajes, sin embargo, tan sólo dos son cultivadas: *Oryza sativa* L., originaria de Asia que se cultiva en todo el mundo, y *Oryza glaberrima* L., cultivada exclusivamente en el oeste del Continente Africano durante los últimos 3.500 años (Arendt y Zannini, 2013).

Existen más de 120.000 variedades diferentes de *Oryza sativa* L., de las cuales aproximadamente 80.000 se conservan en el Genetic Resources of International Rice Research Institute en Filipinas (IRRI, 2015). Existen dos subespecies cultivadas de *Oryza sativa* L., la indica y la japónica (Khush, 1997). Estas variedades de arroz se diferencian morfológicamente por la forma y tamaño del grano, y composicionalmente por su contenido en amilosa y amilopectina, lo que determina la textura y el grado de aglutinación del arroz después de la cocción. La variedad indica representa el 80% del cultivo mundial y ha sido adaptada a las zonas bajas de los trópicos y subtrópicos. Sus granos de arroz son largos y finos y presentan un alto contenido de amilosa (22-30%), de manera que cuando se cocina origina granos secos, suaves y ligeros. La subespecie japónica produce granos más cortos y redondeados, con un menor contenido de amilosa

(15 a 17%), por lo que después de la cocción se aglutinan apareciendo ligeramente pegajosos (Zhou y col., 2002).

Dependiendo del procesado que sufre el grano de arroz, éste se encuentra en el mercado como arroz blanco, arroz integral y arroz vaporizado. El arroz blanco es el más ampliamente consumido a nivel mundial en el que, tras el proceso de descascarillado y pulido, se ha eliminado la cáscara, el salvado y el germen, por lo que es muy rico en almidón. El arroz integral es aquel en el que se ha eliminado sólo la cáscara, y se mantienen el salvado y el germen prácticamente intactos. El arroz vaporizado, por su parte, se obtiene al someter el arroz con cáscara a calor húmedo, y presenta la ventaja de que muchos de los nutrientes del salvado migran al grano una vez descascarillado y pulido, por lo que conserva el 80% del valor nutricional del arroz integral (CEI-RD, 2011; Arendt y Zannini, 2013).

2.1 Producción de arroz

El arroz representa el 29% del total de la producción mundial de cereales. En 2013, el total de la producción mundial de arroz fue de 744,4 millones de TM (496,4 millones de TM de arroz elaborado) (FAO, 2014), siendo el segundo cereal después del trigo en producción y uso para alimentación. La producción del arroz está geográficamente concentrada en países en vías de desarrollado, principalmente más del 85% del total de la producción mundial proviene de Asia (FAOSTAT, 2014). Tan sólo siete países asiáticos (China, India, Indonesia, Bangla Desh, Vietnam, Myanmar y Tailandia) producen y consumen el 80% del arroz del mundo, mientras que América y África producen el 8% y 3%, respectivamente. Con alguna excepción, prácticamente toda la producción de arroz es consumida en los países productores. Además, es de destacar que el cultivo de arroz en países en vías de desarrollo representa una parte importante de los ingresos básicos para la población rural (INEC, 2013).

Aunque la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) informó que la producción mundial de arroz aumentará un 1,8% (equivalente a 12 millones de TM), el mercado internacional de este cereal se enfrenta en la actualidad a una situación especialmente difícil, con una demanda mayor que la oferta y un aumento considerable de los precios (FAO, 2014).

En Ecuador, en 2013, 414.000 Ha de superficie fueron utilizadas para el cultivo de arroz en cáscara, obteniendo una producción de 1,35 millones de TM de este cereal. Estas cifras de producción han permitido abastecer el consumo de arroz en el país, además de generar excedentes que fueron canalizados en exportaciones y centros de acopio (Figura 1). Concretamente, se exportó y acumuló una reserva de 75.000 y 100.000 TM de arroz blanco, respectivamente.

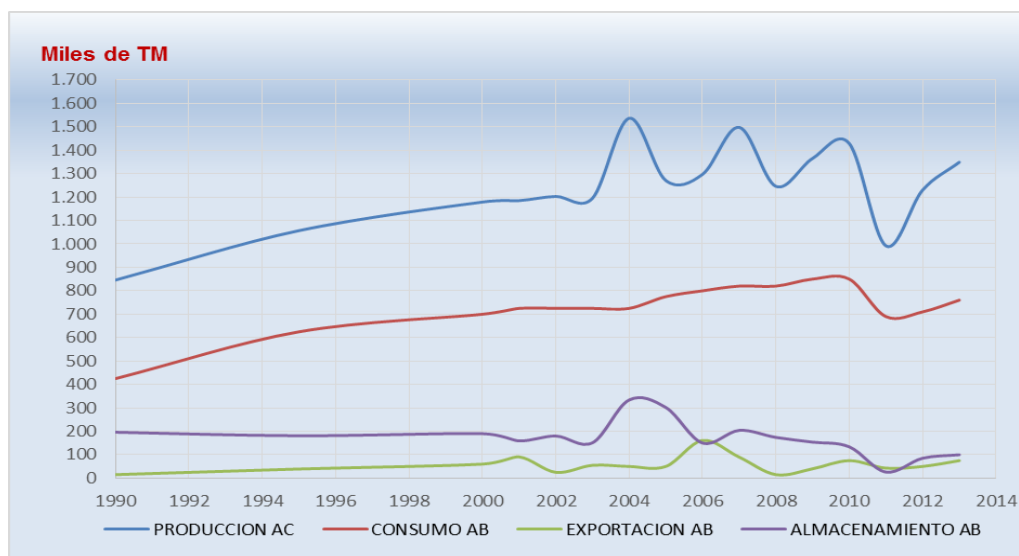


Figura 1. Evolución de la producción de arroz en cáscara (AC), consumo, exportación y almacenamiento de arroz blanco (AB) en Ecuador durante los años 1990 a 2013. (INEC, 2013).

Las zonas de mayor producción de arroz en Ecuador se ubican en las cuencas de dos grandes ríos, las del río Daule y el río Babahoyo, que son zonas bajas e inundables en ciertas épocas del año. Ambos ríos confluyen en el río Guayas, abarcando aproximadamente 40.000 m² y originando la llamada cuenca del Río Guayas (Figura 2), de gran riqueza ecológica y agrícola debido no sólo a la producción de arroz sino también a la producción de otros alimentos como el cacao, el banano y el camarón. Esta cuenca influye de forma notable en la economía de toda la región costera del Ecuador e, incluso, en la serranía ecuatoriana, por lo que más del 40% de la población del país está afectada directamente por sus cosechas y actividades comerciales (Tapia, 2012).

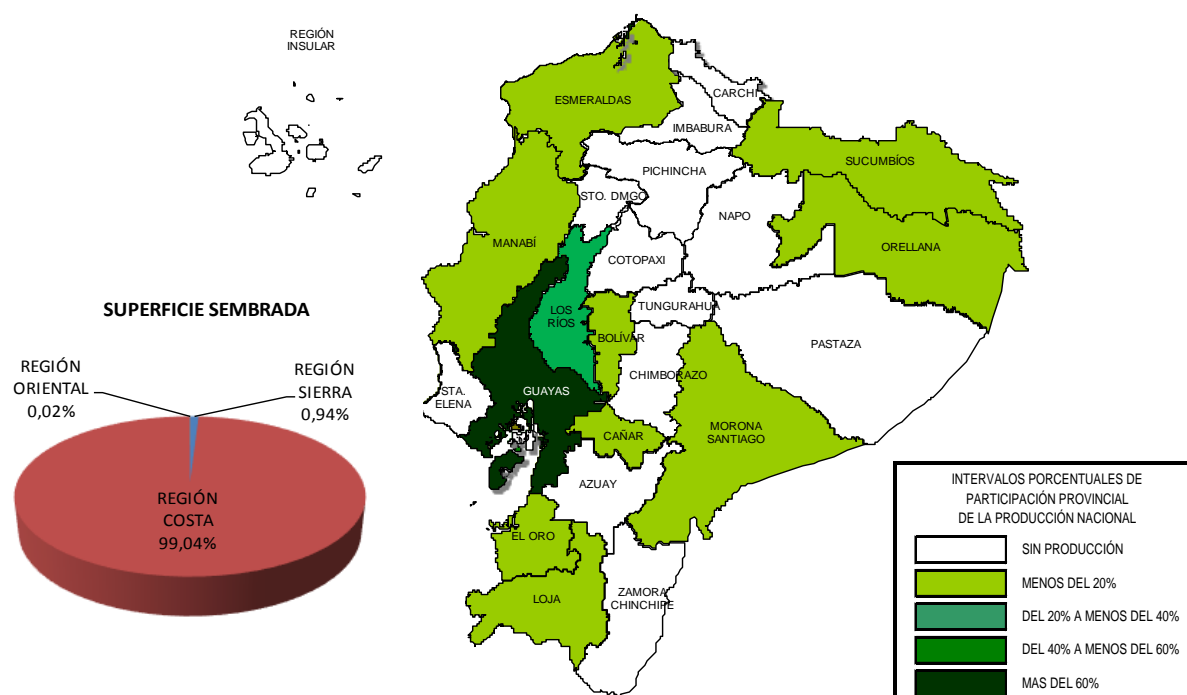


Figura 2. Porcentaje de superficie sembrada y producción de arroz en cáscara en las diferentes regiones de Ecuador: región costera, sierra y oriental durante el año 2013. (INEC, 2013)

Es de destacar que aunque Ecuador presenta zonas con excelentes condiciones para el cultivo del arroz, el rendimiento que se consiguió en 2013 fue uno de los más bajos de Sudamérica (3,8 TM/Ha), superando únicamente a Bolivia (Figura 3). Estos bajos rendimientos de cosecha se asocian al uso de semillas tradicionales no certificadas (73%) ya que el agricultor utiliza normalmente sus propias semillas con el fin de reducir costes. Sin embargo, una selección adecuada de las variedades de arroz y una mejora clara de las prácticas de cultivo y post-cosecha podrían suponer que la producción de arroz fuese notablemente superior a la que se consigue actualmente (Infoarroz, 2014).

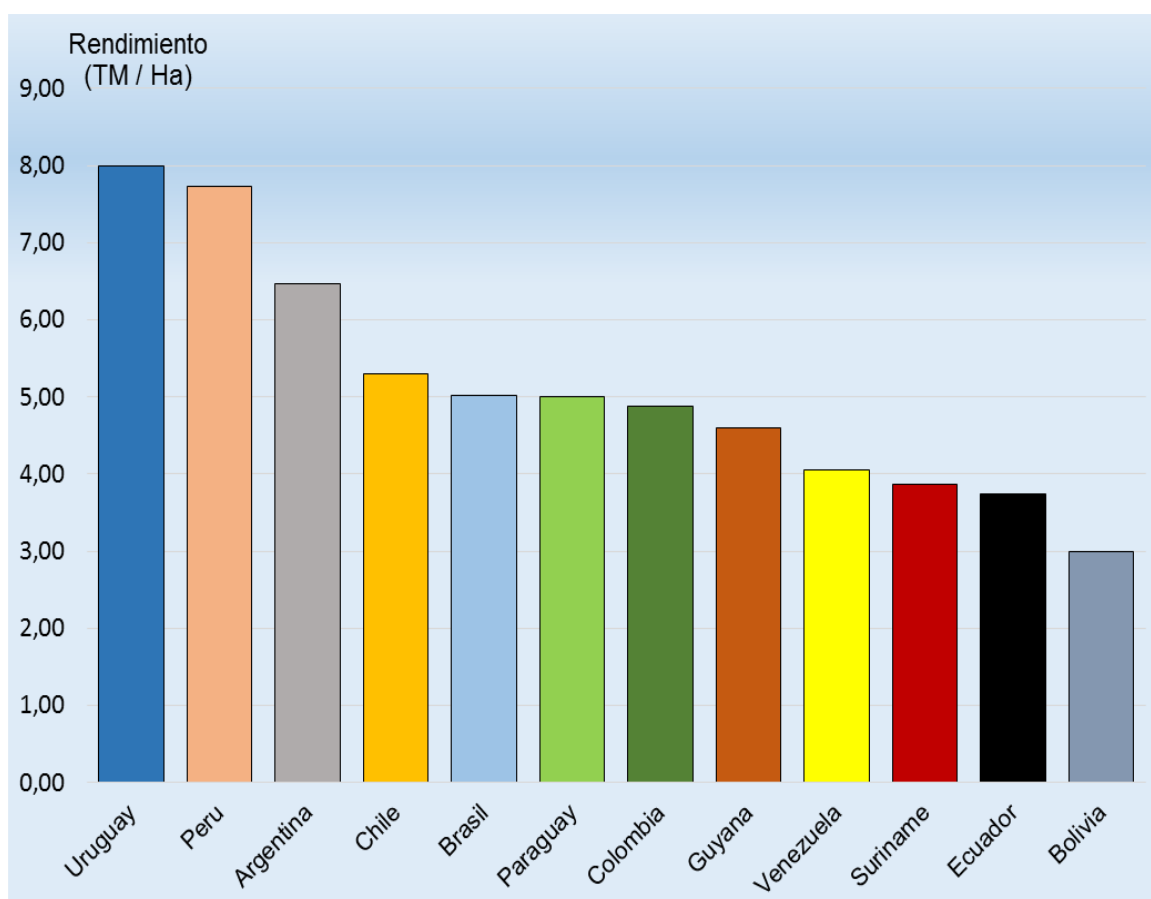


Figura 3. Producción de la cosecha de arroz (TM/Ha) en diferentes países Sudamericanos en el año 2013. (Infoarroz, 2014).

Recientemente, el gobierno ecuatoriano, a través del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), está desarrollando y comercializando variedades de semillas de arroz más productivas. Los programas de mejora genética del INIAP se basan en la obtención de variedades de arroz de alto rendimiento, resistentes o tolerantes a enfermedades y plagas, de buena calidad molinera y culinaria (INIAP, 2014). Las variedades que el INIAP selecciona para su distribución son de grano largo (6,6 a 7,5 mm), extra largo (más de 7,5 mm), translúcido, más del 60% de índice de pilado (grano entero obtenido después del pulido), y de textura suave, que dan lugar a granos sueltos al cocinarse (Tabla 1). En concreto, se está apostando por las variedades INIAP14, INIAP15 e INIAP17 ya que al ser precoces permiten sembrar bajo condiciones de riego en siembra directa tres ciclos al año. La obtención de estas variedades ha contribuido para que desde el año 1990 el país sea autosuficiente en arroz y exporte los excedentes, principalmente a

Colombia. En un futuro próximo, se espera que se comience a comercializar el cultivar experimental Go39839.

En Ecuador, además, existen actualmente industrias locales, como INDIA-PRONACA, que comercializa otras variedades productivas de arroz. Es el caso de las variedades SLF09 y F50 (Tabla 1), que aunque muestran un rendimiento menor que las INIAP, se caracterizan por tener ciclos vegetativos cortos, resistencia a enfermedades y un grano extra largo muy aceptado por sus características culinarias (INDIA-PRONACA, 2014).

Tabla 1. Características de rendimiento (TM/Ha), ciclo vegetativo (días), longitud del grano (mm) e índice de pilado de variedades de arroz ecuatoriano mejoradas por INIAP e INDIA PRONACA.

Variedades	Rendimiento (TM/Ha)	Ciclo vegetativo (días)	Longitud del grano* (mm)	Índice de pilado**
INIAP				
INIAP14	7,00	110-127	7,1	62
INIAP15	7,00	117-128	7,5	67
INIAP17	8,00	117-140	7,7	67
Go39839	7,20	127	7,5	66
INDIA-PRONACA				
SLF09	6,00	114-125	7,2	66
F50	5,80	120-150	7,0	65

*Por el tamaño del grano el arroz se puede clasificar en arroz de grano largo (más de 6 mm), grano medio (5-6 mm) y grano corto (4-5 mm)

** Índice de pilado: Porcentaje de arroz pulido entero resultante del arroz con cáscara y libre de impurezas

2.2 Estructura del grano de arroz y distribución de su composición nutricional

En la Figura 4 se representa la sección longitudinal de la semilla de arroz. La capa más externa se denomina gluma o cascarilla, que representa el 20% de la semilla, que consiste en dos hojas (palea y lema) unidas con un pliegue poco resistente, pero que requiere de cierto trabajo mecánico para separarlas. La cascarilla es rica en sílice y tiene múltiples usos, entre los que destaca, por ejemplo, su empleo actual en la elaboración de paneles solares, siendo una empresa española la pionera en este proceso (El País, 2008).

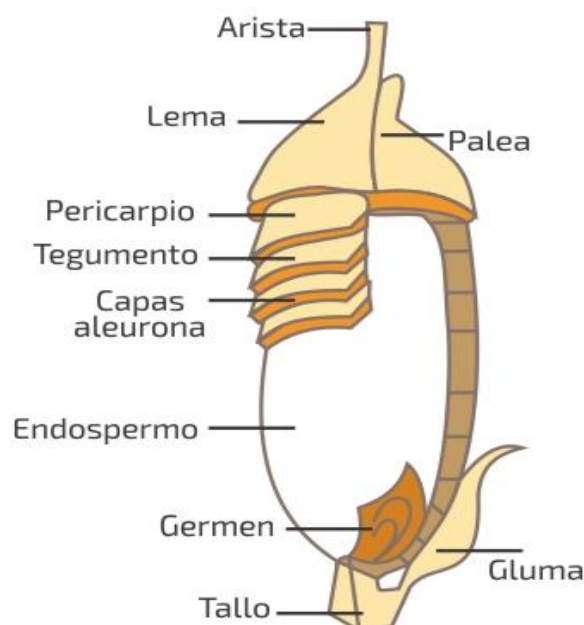


Figura 4. Sección longitudinal de la semilla de arroz.

El grano de arroz descascarillado (cariópside) se denomina arroz integral o marrón debido al color del pericarpio o membrana que le rodea. El arroz integral tiene una estructura semejante a la de otros cereales integrales, formado por el endospermo, germen y el salvado. El endospermo contiene aproximadamente el 90% almidón y el 8% proteína y representa el 89-94% del arroz integral. El germen (embrión) está situado en un lado del endospermo, hacia la base de la cariópside, y contiene cantidades importantes de lípidos y proteínas, y representa del 2 al 3% del arroz integral. El salvado, a su vez, representa entre el 5 y el 8% del arroz integral y está formado por tres capas externas distintas: el pericarpio, el tegumento y las capas de aleurona que rodean el

endospermo y el germen. El salvado de arroz contiene aproximadamente 15% de proteína, 20% de grasas, 50% de carbohidratos, 10% de fibra y 5% de cenizas. (Arendt y Zannini, 2013). Aunque el salvado de arroz es rico en nutrientes, en pequeñas o medianas empresas productoras de arroz se le considera un subproducto y se destina principalmente a alimentación animal. En cambio, en grandes y modernas instalaciones de EEUU, Brasil e India con elevados niveles de producción, el salvado de arroz se aprovecha principalmente para la extracción de aceite, al haber sido incluido por la OMS como aceite vegetal, al presentar en su composición compuestos con propiedades saludables como la vitamina E, los ácidos grasos poliinsaturados, los fitoesteroles y el γ -orizanol. El empleo del salvado de arroz como fuente proteica y de estos compuestos bioactivos como el γ -orizanol abre una oportunidad para nuevas aplicaciones y desarrollo de alimentos (Bhatnagar y col., 2014). Del salvado de arroz se pueden obtener, además, otros productos valiosos como ceras, lecitina, materia prima para jabones y estearinas. El bajo coste del salvado de arroz en la producción de biodiesel frente a otras fuentes de cereales puede considerarse también una gran oportunidad comercial (Zhang y col., 2013).

Al retirar el salvado y el germen del grano de arroz integral, mediante el proceso de pulido, se obtiene el arroz blanco que consiste, básicamente, en el endospermo amiláceo de la semilla y se caracteriza por dos regiones distintas, la capa de la subaleurona y la región central. La capa de la subaleurona está conformada por un número limitado de pequeños gránulos de almidón de forma ovalada rodeados por proteínas, mientras que la región central está compuesta principalmente de grandes gránulos de almidón muy compactos y rodeados de material proteico denso (Arendt y Zannini, 2013).

2.3 Composición nutricional y fitoquímicos del arroz integral y sus efectos saludables

El arroz integral proporciona, en términos generales, la misma energía que el arroz blanco, principalmente debido a su contenido en carbohidratos. Sin embargo, su contenido y calidad de proteínas y lípidos, fibra alimentaria, minerales y vitaminas es, en general, notablemente superior (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de nutrientes del arroz blanco y arroz integral.

Nutrientes	Arroz blanco	Arroz integral
Proximal		
Agua (g/100g)	11,62	10,37
Energía (Kcal/100g)	365	370
Proteína (g/100g)	7,13	7,94
Lípidos (g/100g)	0,66	2,92
Cenizas (g/100g)	0,64	1,53
Carbohidratos (g/100g)	79,95	77,24
Fibra alimentaria total (g/100g)	1,3	3,5
Minerales		
Calcio (mg/100g)	28	23
Hierro (mg/100g)	0,8	1,47
Magnesio (mg/100g)	25	143
Fósforo (mg/100g)	115	333
Potasio (mg/100g)	115	223
Sodio (mg/100g)	5	7
Cinc (mg/100g)	1,9	2,02
Cobre (mg/100g)	0,22	0,28
Manganeso (mg/100g)	1,09	3,74
Selenio (mg/100g)	15,1	23,4
Vitaminas		
Tiamina (mg/100g)	0,07	0,40
Riboflavina	0,05	0,09
Niacina (mg/100g)	1,6	5,09
Ácido Pantoténico (mg/100g)	1,01	1,49
Piridoxina (mg/100g)	0,16	0,51
Ácido fólico (μg/100g)	8	20
Vitamina E (mg/100g)	0,11	1,2
Vitamina K (μg/100g)	0,1	1,9

Fuente: Base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para estándares de referencia, versión 27.

La composición en nutrientes del arroz integral se ve complementada, además, con la presencia de fitoquímicos que se definen como metabolitos secundarios que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activos, que no son nutrientes esenciales, pero tienen efectos positivos en la salud. En el arroz integral los principales fitoquímicos que se han descrito incluyen el ácido γ -aminobutírico (GABA), los compuestos fenólicos y el γ -orizanol que han demostrado tener un amplio abanico de actividades biológicas (antioxidante, hipolipémica, hipoglucémica, antiaterogénica, antihipertensiva, anticancerígena) que pueden ser las responsables de su efecto beneficioso en la salud.

2.3.1. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono o carbohidratos son los componentes mayoritarios del arroz integral, principalmente constituidos por almidón (80%) y pequeñas cantidades de sacarosa (1%) (Frei y col., 2003). El almidón del arroz está formado por polisacáridos de amilosa y amilopectina. Las moléculas de amilosa son esencialmente cadenas lineales que contienen 10^4 - 10^5 unidades α -D-glucosa unidas por enlaces α -1,4. Las moléculas de amilopectina, son mucho más largas y complejas, comprendiendo entre 10^6 - 10^7 unidades de α -D-glucosa unidas por enlaces α -1,4 en sus zonas lineales, y por enlaces α -1,6 en sus puntos de ramificación. El contenido en amilosa, o la proporción de amilosa/amilopectina en el grano de arroz es uno de los índices más importantes para la evaluación de la calidad del arroz, ya que repercute directamente en las características nutricionales del arroz cocido y en sus propiedades físicas. Se denomina arroz waxy a aquellos arroces con un contenido en amilosa $< 17\%$, que originan arroces pegajosos después de la cocción, y arroz no-waxy los que contienen entre 17% y 39% de amilosa, que dan lugar a arroces sueltos y enteros después de la cocción (Yu, 2012).

La mayor parte del almidón de la dieta procede de alimentos cocidos y se digiere rápidamente en el intestino delgado. La variedad japónica, arroz waxy pobre en amilosa, tiene un índice glucémico de 109, relativamente alto comparado con variedades de arroz con mayores contenidos de amilosa, que presentan un índice glicémico de 69, mientras que ciertas variedades ricas en almidón retrogradado presentaron un índice glicémico entre 69 y 87 (Juliano, 1994; Yu, 2012). Dietas con un menor índice glicémico mejoran el perfil metabólico en la diabetes y están asociadas con un menor riesgo de desarrollar

diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Villegas y col., 2007). Estudios en animales de experimentación han demostrado que el arroz integral con alto contenido en amilosa ejerce un efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico (Yu, 2012).

El almidón resistente es la suma de aquella fracción de almidón y de sus productos de hidrólisis que no se absorben en el intestino delgado, por lo que es considerado parte de la fibra alimentaria. El almidón resistente favorece el tránsito intestinal, la retención de agua y el aumento del volumen de las heces. El contenido de almidón resistente en distintas variedades de arroz oscila entre 0,85% y 8,45%, variabilidad que puede deberse a factores genéticos, grado de madurez del grano de arroz y estructura molecular del grano de almidón (Yang y col., 2005; Shu y col., 2014), como se ilustra en la Figura 5.

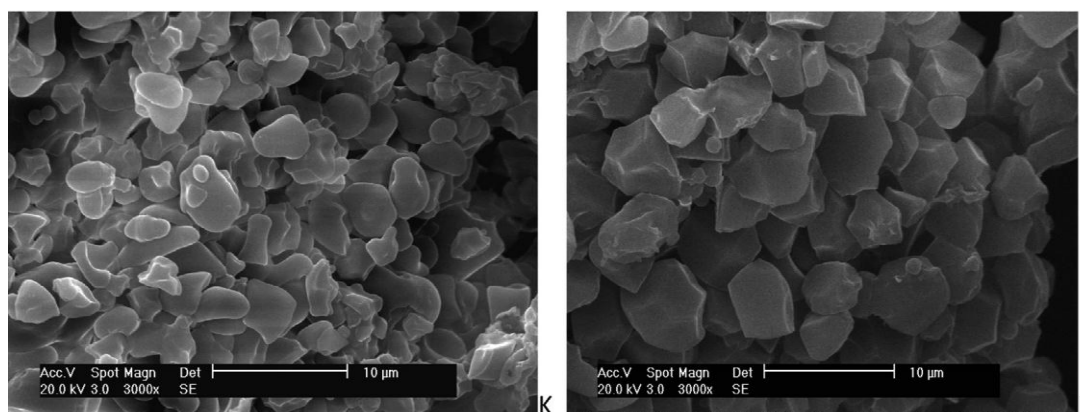


Figura 5: Imagen microscópica de dos variedades de arroz integral con contenidos de almidón resistente de 8,45% (K) y 0,85% (L), respectivamente. (Shu y col., 2014)

Se ha puesto de manifiesto que el consumo de arroz con alto contenido en almidón resistente conduce a una disminución de la glucemia postprandial y a la resistencia a la insulina (Yu, 2012). A su vez, el almidón resistente en el intestino grueso sirve de sustrato fermentativo de la microbiota intestinal, produciendo ácidos grasos de cadena corta a los que se les ha asociado con un descenso del riesgo a sufrir enfermedades no infecciosas y mejorar la salud intestinal. Cabe mencionar que la hidrólisis del almidón resistente produce oligosacáridos prebióticos cuya fermentación en el intestino delgado por la microbiota genera propionato de etilo, el cual reduce los niveles de colesterol (Fardet, 2010).

La fibra alimentaria es otro constituyente resistente a la acción de las enzimas gastrointestinales, llegando intacta al intestino grueso donde se utiliza como sustrato fermentativo por la microbiota intestinal. La fibra alimentaria está constituida por celulosa, hemicelulosa, galactooligosacáridos, pectinas, almidón resistente, lignina y compuestos que forman complejos con la lignina, por ejemplo fitatos y compuestos fenólicos, entre otros. Estos componentes se engloban dentro de la fracción de fibra soluble o insoluble dependiendo de su grado de solubilidad y fermentabilidad (Figura 6) (AACC, 2001). El contenido en fibra alimentaria del arroz integral puede oscilar entre el 2,9% y el 4,5% (Champagne y col., 2004) dependiendo de la variedad de arroz y de las condiciones edafoclimáticas durante su cultivo (Lin y Lai, 2011).

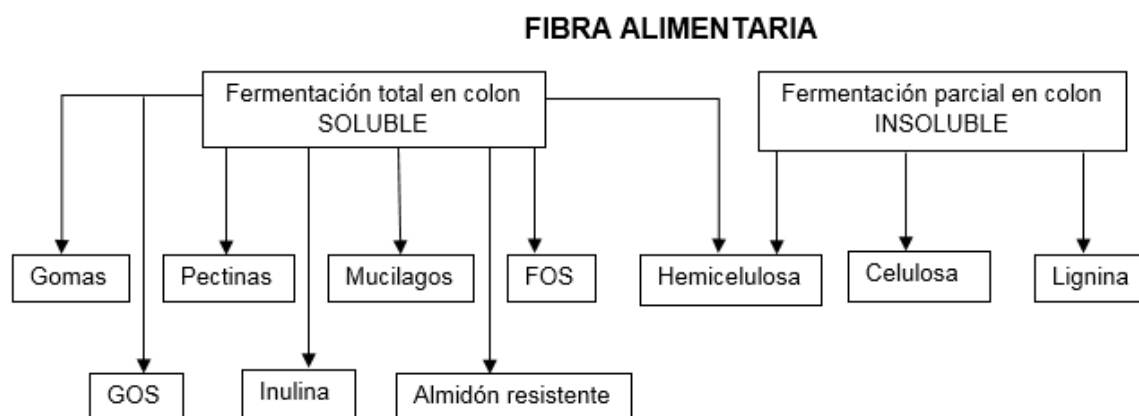


Figura 6: Clasificación de la fibra según el grado de solubilidad y fermentabilidad (Escudero y González, 2006)

Las propiedades beneficiosas de las dietas ricas en cereales integrales, como es el caso del arroz integral, se sustentan en el alto contenido de fibra alimentaria responsable de la mejora de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico (Megat Rusydi, 2011) y la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes, diverticulosis y cáncer de colon (AACC, 2001; Cui y Roberts, 2009). Estos beneficios están relacionados con el tipo de fibra y la relación fibra insoluble y soluble, cuya recomendación es que esté en proporción 3:1, respectivamente. A modo de ejemplo, pacientes diabéticos, tanto tipo I como tipo II, que consumieron una dieta con 40 g de fibra de salvado de arroz (con una relación fibra insoluble/soluble de 3:1) durante 1

semana consiguieron reducir la glucosa en sangre de absorción rápida y postprandial en comparación con los que consumieron una dieta baja en fibra (Silva y col., 2005).

Además, de su actividad hipoglucémica, otros componentes de la fibra como las hemicelulosas han demostrado tener un papel importante en la prevención de cáncer de colon (Aoe y col., 1993), y disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos sanguíneos (Normand y col., 1987). A su vez, dietas suplementadas con fibra insoluble de arroz integral con un 70% en hemicelulosas podrían aminorar los síntomas de síndrome de colon irritable, atenuar la excreción refleja inmediata y la hiperalgesia en estos pacientes (Kanauchi y col., 2010).

Por otra parte, los polisacáridos del salvado de arroz han mostrado un papel protector secuestrando radicales libres hidroxilo y superóxido, consiguiendo la supresión de la oxidación lipídica, con lo que pueden hacer frente al progreso de numerosas enfermedades crónicas (Zha y col., 2009). A su vez, estos polisacáridos también pueden ejercer una acción inmunoestimuladora (Yamagishi y col., 2008). El compuesto MGN-3/Biobran, derivado del arabinoxilano del salvado de arroz, representa un potente coadyuvante novedoso para el tratamiento de cáncer de mama (Gollapudi y Ghoneum, 2008).

Aunque no existe un acuerdo aún sobre la cantidad de fibra a consumir para obtener un efecto beneficioso para la salud, hay estudios que sugieren que la ingesta de 20 - 35 g por día para los adultos reduce entre el 12 y el 20% el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Escudero y González, 2006).

2.3.2. Proteínas

Las proteínas son los segundos constituyentes mayoritarios del grano de arroz integral después del almidón y representan aproximadamente el 8% de su composición. La cantidad de proteínas varía según diferentes factores, entre los que destacan la variedad y las condiciones edafoclimáticas de su cultivo. En este caso, el valor de proteína en el arroz puede incrementarse con bajas densidades de siembras debido a una mayor disponibilidad de nitrógeno por planta (Dendy y Dobraszczyk, 2004; Arendt y Zannini, 2013).

El contenido en proteína es un factor importante en las propiedades tecnológicas del grano de arroz influyendo sobre la capacidad de hidratación y absorción de agua del grano de almidón, reduciendo la pastosidad y la capacidad de cristalizarse, y aumentando la temperatura de gelatinización. Así, altos contenidos de proteína aumentan el tiempo de cocción y la dureza del grano cocido, e influyen negativamente sobre el sabor (Arendt y Zannini, 2013).

El contenido total de aminoácidos del arroz integral es ligeramente superior al del arroz blanco (Figura 7), por encontrarse el 15,8% de la proteína en el salvado. La lisina es el aminoácido limitante, aunque es de destacar que su contenido en el grano de arroz es superior al del resto de los cereales.

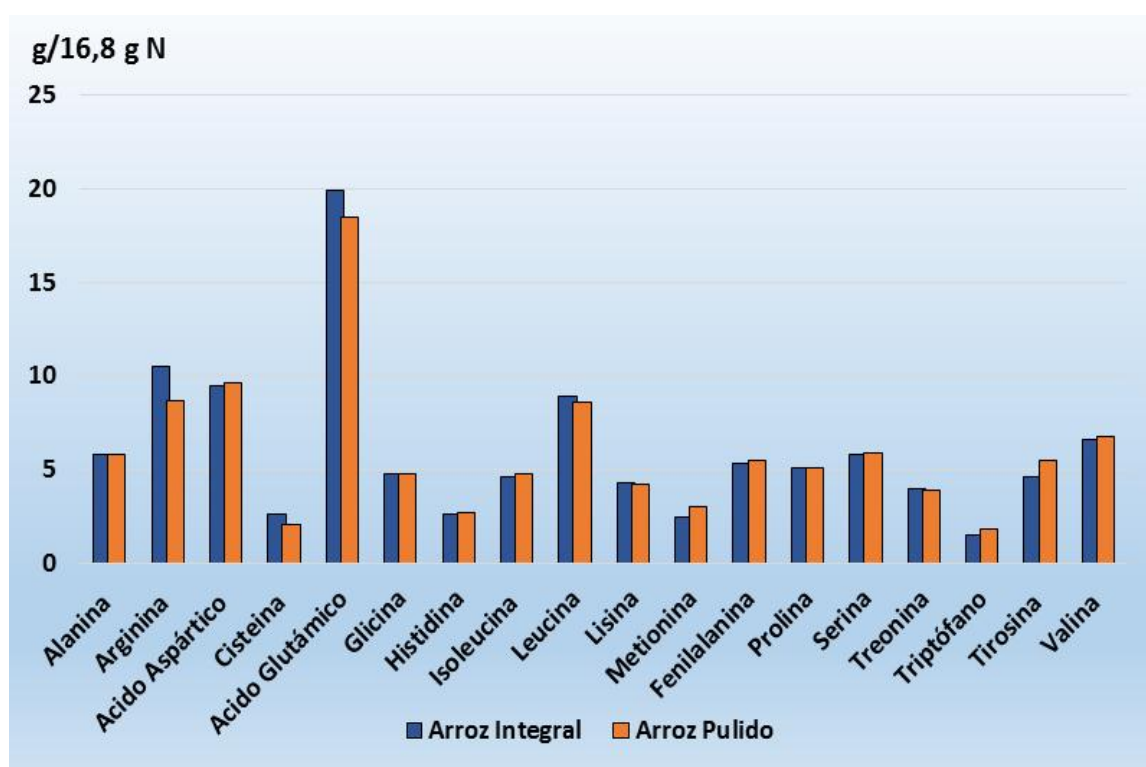


Figura 7: Contenido de aminoácidos en el arroz integral y en el arroz pulido expresado como g/16,8 g N. Elaborada a partir de los datos de (Juliano, 1994).

La proteína del arroz tiene una calidad superior a la de otros cereales e, incluso, a la de la carne de vacuno. Como se puede observar en la Figura 8, el valor biológico de la proteína del arroz integral es uno de los más altos después del centeno y semejante al de la carne de vacuno. A su vez, la utilización neta de la proteína del arroz es superior a la

del resto de los cereales e, incluso, a la de la carne de vacuno. Estos resultados se deben al contenido importante de lisina.

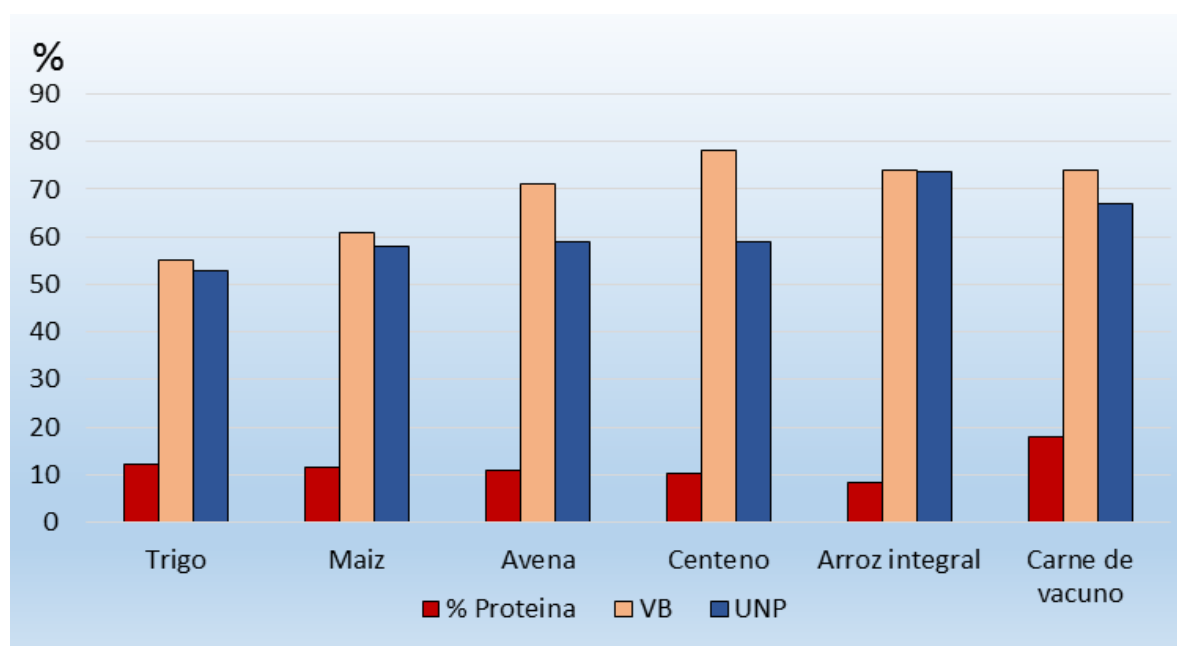


Figura 8: Contenido de proteína, (%), valor biológico y utilización neta de proteína de algunos cereales como el trigo, maíz, avena, centeno, arroz integral y carne de vacuno. Adaptada de los datos de (Arendt y Zannini, 2013)

Basándonos en su solubilidad (Osborne, 1924), las proteínas se distribuyen de diferente manera en el arroz integral que en el arroz blanco (Tabla 5). El arroz no contiene gliadinas (fracción de las prolaminas que constituye el gluten en ciertos cereales como el trigo), por lo que el arroz se considera un alimento libre de gluten apto para celíacos (Shih, 2003; Rosell y col., 2014) (Tabla 5).

Tabla 5. Fracciones proteicas del grano de arroz blanco y del grano integral expresada como % respecto al total de proteína

Fracción proteica	Arroz pulido ^a (% del total)	Arroz integral ^b (% del total)
Albúminas	5,0	11,0
Globulinas	12,0	10,0
Glutelinas	80,0	77,0
Prolaminas	3,0	2,0

Fuente: a) (Juliano, 1994); b) Wieser y col., 1980).

Distintos estudios han demostrado el potencial efecto saludable del consumo de proteínas de arroz por el efecto hipocolesterolémico y antiaterogénico observado en modelos animales (Yang y Kadowaki, 2009). Estudios en ratones concluyen que las prolaminas del arroz potencian la respuesta inmunológica antileucémica (Chen y col., 2010). Por otra parte, la hidrólisis de las proteínas del arroz libera péptidos con actividad antioxidante similar al α -tocoferol (Zhang y col., 2009).

2.3.3. Lípidos

El arroz integral presenta un contenido lipídico próximo al 3 %, siendo uno de los cereales que menos grasa contiene, a excepción del trigo y el centeno. La mayor parte del contenido lipídico en el grano de arroz se encuentra en las capas externas y en el germen por lo que el arroz integral es más rico en ácidos grasos que el arroz blanco. Los ácidos grasos mayoritarios en el arroz son el ácido linoleico (18:2), el ácido oleico (18:1) y el palmítico (16:0) que constituyen el 90% del total de sus ácidos grasos y, aunque tanto el arroz integral como el arroz blanco contienen estos tres ácidos grasos mayoritariamente (Figura 9), el arroz integral destaca por su mayor contenido (Tabla 2).

Los ácidos esteárico, mirístico y linolénico se encuentran en cantidades inferiores al 4% (Emperatriz Pacheco y Domínguez, 2002).

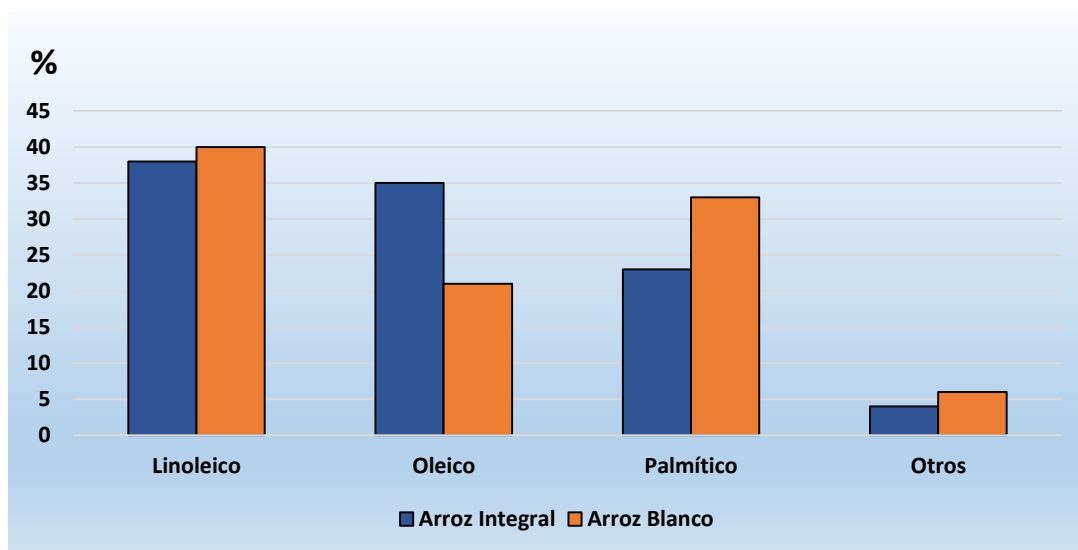


Figura 9: Porcentaje de ácidos grasos en la fracción lipídica (Arendt y Zannini, 2013).

El ácido linoleico, ácido graso esencial poliinsaturado, tiene un papel esencial en la salud visual, el desarrollo mental, y también posee propiedades antiinflamatorias (Choque y col., 2014).

En la fracción lipídica del arroz integral se encuentran también el γ -orizanol, las lecitinas, los tocoferoles y los tocotrienoles que se presentan en elevadas concentraciones en el aceite de salvado de arroz, el cual ha mostrado efecto protector frente al daño oxidativo causado por la oxidación lipídica y una mejora del metabolismo del colesterol (Yean y col., 2008).

Los lípidos amiláceos, son aquellos unidos a almidones, representan una pequeña proporción (0,5-1%) de los lípidos del arroz. Estos lípidos condicionan la digestibilidad del almidón y, por tanto, forman parte del almidón resistente. Por lo general, los complejos amilosa-lípido en los que intervienen monoglicéridos de cadena larga tienen mayor resistencia a la digestión *in vitro* que los complejos con monoglicéridos de cadena corta o insaturados (Arendt y Zannini, 2013). Por otra parte, la estructura amilosa-lípido afecta también en otras propiedades físicas del arroz, como la temperatura de gelatinización y el grado de pegajosidad del grano de arroz cocido.

2.3.4. Elementos minerales

El mayor contenido en minerales del arroz integral se encuentra en la capa más externa, de modo que el salvado constituye el 51% del total de minerales, y su contenido va disminuyendo hacia el interior, de manera que el germen contiene tan sólo un 10% del total (Arendt y Zannini, 2013).

El contenido en minerales del arroz integral es relativamente bajo para cubrir los requerimientos nutritivos cuando el arroz se consume como alimento básico (Tabla 2). Los principales minerales en el grano de arroz integral son el potasio y el fósforo, aunque este último se encuentra en forma de fitato lo que condiciona su biodisponibilidad.

El arroz integral proporciona también calcio y magnesio como minerales esenciales mayoritarios. En menores cantidades se encuentran hierro, zinc, cobre, manganeso y sodio, y su contenido depende tanto de la variedad estudiada como del tipo de suelo, siembra, fertilizantes utilizados, condiciones de cultivo y recolección (Heinemann y col., 2005). En los últimos años, la presencia de selenio en los alimentos vegetales ha cobrado interés por sus beneficios en la salud debido al efecto antioxidante y su contenido, en el arroz integral, varía dependiendo de su procedencia, cuyo contenido medio oscila de 0,6 µg/Kg en Egipto hasta 95 µg/kg en ciertas zonas de U.S (Williams y col., 2009).

2.3.5. Vitaminas

El arroz integral es una fuente importante de vitaminas hidrosolubles, específicamente de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2) y niacina (vitamina B3), junto con ácido pantoténico (vitamina B5) y piridoxina (vitamina B6), principalmente concentradas en el salvado de arroz (Dendy y Dobraszczyk, 2004). En este mismo tejido se encuentran las vitaminas E y K, por lo que la mayor parte de las vitaminas se pierden considerablemente durante el pulido del arroz (Arendt y Zannini, 2013) (Tabla 2).

Por otra parte, el contenido de vitamina A en el arroz es muy limitada o nula, y su deficiencia en áreas consumidoras de arroz densamente pobladas de Asia, África y América Latina está asociada a la ceguera irreversible y a infecciones graves y muertes por diarrea, enfermedades respiratorias y víricas. La variedad transgénica Golden Rice 2 acumula hasta 31 µg/g de β-caroteno (provitamina A) en su endospermo, lo que está

contribuyendo en parte a paliar la deficiencia de esta vitamina entre esta población (Datta y Khush, 2002; Yu, 2012). Así mismo, el arroz es deficitario en ácido fólico (vitamina B9) y se han conseguido variedades transgénicas con un contenido en ácido fólico 100 veces superior a las variedades convencionales (Storozhenko y col., 2007).

Es importante resaltar al arroz integral como fuente de vitamina E (1,2 mg/100g (m.s.) (Yu, 2012), que se encuentra representada en partes iguales tanto por tocoferoles como por tocotrienoles (Aggarwal y col., 2010). Su germen contiene 5 veces más vitamina E que el salvado (Yu, 2012). Al igual que otros constituyentes, el contenido en los componentes de la vitamina E en el grano de arroz integral depende tanto de factores genéticos como de las condiciones edafoclimáticas de su cultivo e, incluso del tiempo y almacenamiento del grano (Pascual y col., 2013).

La función más importante de la vitamina E en el cuerpo es su actividad antioxidante y su efecto vitamínico en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares jugando un papel primordial en el mantenimiento de la estructura y función neurológica (Sen y col., 2006). Además interviene en la función del sistema inmunológico, en la reparación del ADN y en otros procesos metabólicos.

Los tocotrienoles poseen una mayor actividad antioxidante y un efecto antiinflamatorio, anticancerígeno, antiolesterolémico y neuroprotector superior que los tocoferoles (Aggarwal y col., 2010; Yu, 2012). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que un extracto lipofílico de aceite de salvado de arroz integral, Ricetrienol®, que contiene tocoferoles, tocotrienoles y fitoesteroles ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo en ratones obesos con diabetes mellitus (Kanaya y col., 2004). Estos resultados sugieren que dietas ricas en arroz integral que proporcionan los constituyentes de la vitamina E pueden ejercer beneficios saludables significativos en el control del síndrome metabólico y frente a diversos tipos de cáncer.

2.3.6. Fitatos

El arroz integral, al igual que el resto de los cereales integrales, presentan un elevado contenido en ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6 fostato), con valores que oscilan entre 7,2 y 11 g/Kg (Liang y col., 2007). El ácido fítico es el principal responsable de la

baja biodisponibilidad de los elementos minerales divalentes (hierro, calcio y zinc) y de las proteínas, con los que forma complejos no asimilables disminuyendo su valor biológico y, en consecuencia, puede causar importantes problemas de nutrición (Yu, 2012). Con el fin de aumentar la disponibilidad de los minerales, en el arroz se han conseguido mutantes con un bajo contenido de ácido fítico (Liu y col., 2007). Uno de ellos presentó un contenido de fitatos un 58,4% inferior manteniendo prácticamente constante el contenido de fósforo y con una mayor disponibilidad mineral (Ren y col., 2007).

A parte de los efectos negativos descritos sobre el ácido fítico, este compuesto ha sido identificado como agente antioxidante y se ha demostrado que los fitatos de arroz y sus derivados son potentes protectores frente al cáncer de páncreas y colon (Somasundar y col., 2005; Norazalina y col., 2010). Se ha descrito su uso como agente terapéutico frente a distintas enfermedades tales como la diabetes mellitus, la aterosclerosis, las enfermedades coronarias, la litiasis en el riñón, así como también, frente al VIH y contra la intoxicación por metales pesados (Kumar y col., 2010; Albarracín y col., 2013).

2.3.7. Ácido γ -aminobutírico

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico que se forma por la α -descarboxilación irreversible del ácido glutámico por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (Kim y col., 2012) (Figura 10).

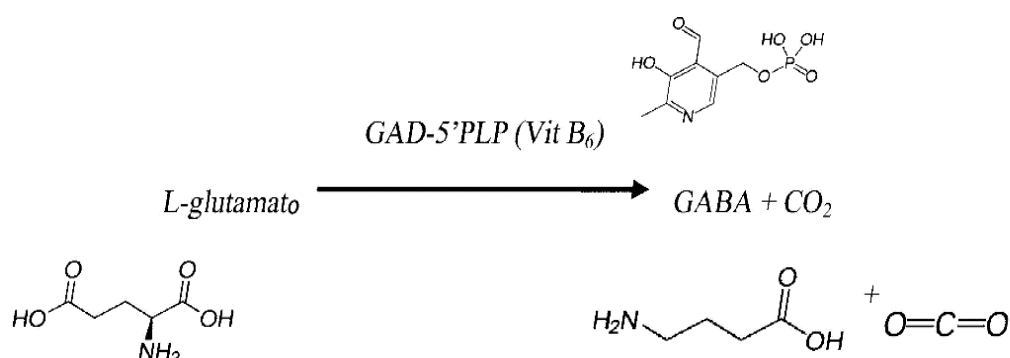


Figura 10: Descarboxilación del ácido glutámico o sus sales mediante la reacción catalizada por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (Kim y col., 2012).

El contenido de GABA en el arroz integral oscila entre 0,01 y 0,12 mg/g, cantidades que dependen de las variedades de arroz y condiciones de cultivo (Roohinejad y col., 2010). En las plantas, el GABA se encuentra involucrado en su crecimiento y en la defensa contra insectos fitófagos. En los animales, se encuentra en grandes cantidades en el cerebro siendo el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso simpático, además es un agente potenciador de la secreción de insulina en el páncreas. Al GABA también se le atribuye un efecto antihipertensivo, puede prevenir el crecimiento de células cancerígenas, tiene efecto tranquilizante y puede mejorar los procesos cognitivos (Wu y col., 2012; Diana y col., 2014).

2.3.8. γ -orizanol

El γ -orizanol incluye un grupo de ésteres del ácido ferúlico con fitoesteres o alcoholes triterpénicos. Aunque se han identificado α -, β - y γ -orizanol, este último es el mayoritario en el arroz integral, que está principalmente formado por cicloartenil ferulato, 24-metilenecicloartanil ferulato, campesteril ferulato y sitosteril ferulato (Figura 11) (Miller y Engel, 2006; Cho y col., 2012). Además, otros alcoholes triterpénicos y esteroides se pueden conjugar con el ácido ferúlico y se han identificado más de 20 complejos (Lemus y col., 2014). La proporción de esteril ferulatos en el arroz integral y en el salvado de arroz tiene una enorme variabilidad que parece depender tanto de aspectos genéticos como de las condiciones edafoclimáticas y de almacenamiento del arroz integral (Miller y Engel, 2006). El γ -orizanol se encuentra presente en el arroz integral con un valor medio de 8,06 mg/100 g (Roohinejad y col., 2010).

Desde su descubrimiento, el γ -orizanol ha sido relacionado con numerosos beneficios sobre la salud, principalmente debido a su capacidad de inhibir la oxidación (Nyström y col., 2006). Las funciones del γ -orizanol se han recogido extensamente en la bibliografía (Lerma-García y col., 2009), en la que destaca su papel como antioxidante natural. Su efecto antioxidante junto con la sinergia con otros compuestos bioactivos como GABA, vitamina E, ácidos grasos insaturados y compuestos fenólicos han contribuido a disminuir los niveles de colesterol en sangre en individuos hipercolesterolémicos (Murata y col., 2007). Tanto el γ -orizanol como el ácido ferúlico pueden ejercer efectos antiaterogénicos, pero mediante diferentes mecanismos. A niveles

semejantes, el γ -orizanol tiene mayor efecto en el descenso de los niveles de lipoproteínas plasmáticas de baja densidad y en el aumento de las lipoproteínas de alta densidad que el ácido ferúlico, posiblemente debido a su mayor poder de excretar colesterol y sus metabolitos a través de las heces (Wilson y col., 2007; Mohd. Esa y col., 2013; Imam y col., 2014). El γ -orizanol, además, ha demostrado ser efectivo reduciendo el riesgo de cáncer de colon (Kong y col., 2009). Estos compuestos se utilizan como nutracéuticos en el tratamiento de la diabetes, la menopausia, alergias e, incluso, como agente preventivo en enfermedades inflamatorias gastrointestinales (Lemus y col., 2014).

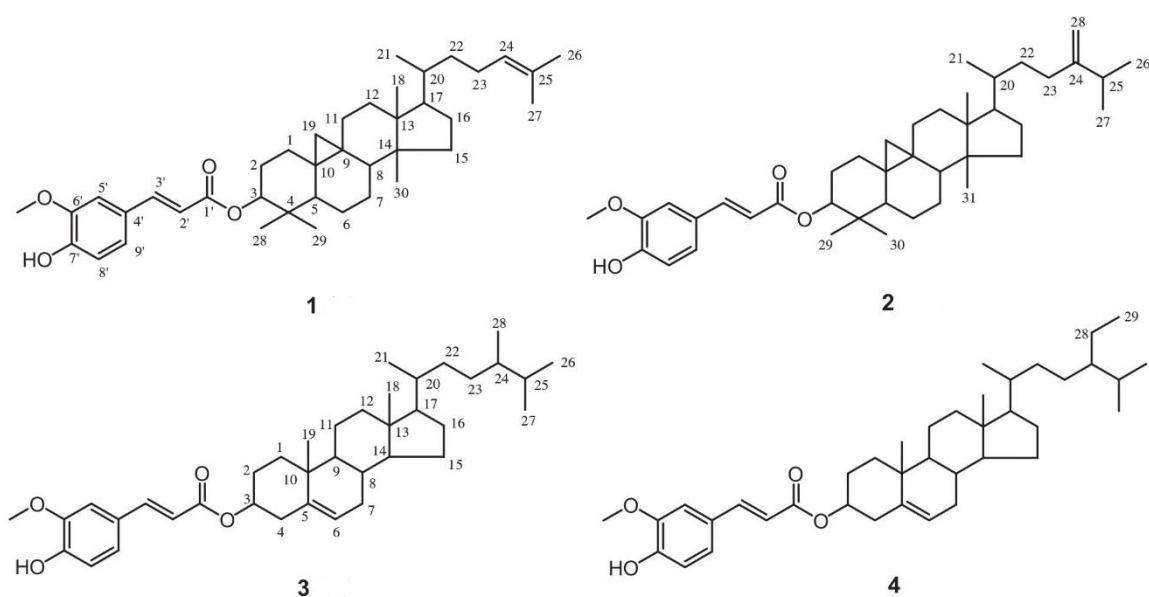


Figura 11: Estructura química de esteril ferulatos identificados en una mezcla comercial de γ -orizanol de arroz integral. 1: Cicloartenil ferulato; 2: 24-metilenecicloartenil ferulato; 3: Campesteril ferulato; 4: Sitosteril ferulato (Cho y col., 2012).

2.3.9. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son aquellos que contienen un anillo bencénico con uno o más grupos hidroxilos cuya síntesis en las plantas sigue la ruta de los fenilpropanoides, en la que las enzimas fenilalanina amonio liasa y cinamato 4-hidroxilasa tienen un papel importante (Shih y col., 2008; He y col., 2011).

En el arroz integral, el contenido de compuestos fenólicos puede variar desde 69 a 274 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g dependiendo de su variedad,

condiciones de cultivo y manejo post-cosecha (Goffman y Bergman, 2004; Butsat y Siriamornpun, 2010; Moongngarm y Saetung, 2010). Generalmente, se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos, siendo los dos primeros los principales compuestos fenólicos en el arroz integral. El mayor contenido de flavonoides se ha observado en arroz integral negro y rojo por su alto contenido de antocianinas (Zhou y col., 2014), en cambio, los principales ácidos fenólicos en el arroz integral son compuestos hidroxicinámicos, encontrándose mayoritariamente los ácidos ferúlico (60,4%), *p*-cumárico (29,4%) y sinápico (10,2%) y, en menor, proporción el ácido cafeico y siríngico (Butsat y Siriamornpun, 2010; Yu, 2012). La mayor parte de los compuestos fenólicos en el arroz integral no se encuentran de forma libre o soluble, sino que se encuentran unidos a la celulosa y lignina de las paredes celulares, o a proteínas mediante enlaces tipo éster (62%) (Ti y col., 2014).

Muchos estudios indican que los ácidos fenólicos solubles, libres y conjugados, así como los ácidos fenólicos ligados insolubles tienen diferentes beneficios potenciales para la salud. Los ácidos fenólicos solubles pueden ser absorbidos rápidamente en el estómago y en el intestino delgado para luego distribuirse por todo el organismo, aportando beneficios a la salud como la inhibición de la oxidación del colesterol LDL y de los liposomas (Chandrasekara y Shahidi, 2011). Los compuestos fenólicos ligados insolubles, que contribuyen en un 71% a la actividad antioxidante (Adom y Liu, 2002), serían liberados solo en el colon, en especial el ácido ferúlico conjugado debido a su unión con la fibra alimentaria, desempeñando un papel importante en la prevención del cáncer de colon y atenuando la inflamación (Shao y Bao, 2015).

Los ácidos hidroxicinámicos tienen una potente actividad antioxidante que se debe, en primer lugar, al ácido cafeico, seguido por el ácido sinápico, el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico (Fan y col., 2009). Sin embargo, todos los compuestos fenólicos presentes en el arroz integral tienen una alta actividad antioxidante y pueden contribuir en la protección frente a enfermedades degenerativas como la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares, en las que están involucrados especies reactivas de oxígeno (Ohnishi y col., 2004; Eun y col., 2007; Dipti y col., 2012). El ácido cafeico, sinápico y ferúlico han mostrado actividad inhibidora de la proliferación de células cancerígenas, siendo el ácido cafeico el más activo entre los distintos ácidos fenólicos examinados (Fan y col., 2009).

2.3.10. Otros componentes con efectos saludables

Junto con los componentes ya mencionados, en el arroz integral y específicamente en su salvado, se han encontrado fitoesteroles con actividad antioxidante que reducen la absorción de colesterol en el intestino y, consecuentemente, los niveles en sangre de colesterol total y unido a las lipoproteínas de baja densidad (Kris-Etherton y col., 2002).

También se ha aislado e identificado el alcaloide 4-carboetoxi-6-hidroxi-2-quinolona en la aleurona de arroz integral negro, que ha mostrado tener actividad antioxidante (Chung y Shin, 2007). Otro alcaloide aislado en ese mismo arroz ha sido la orizadina, que ha mostrado tener un efecto secuestrador de radicales libres y protector del daño celular inducido por H_2O_2 , por lo que se le ha considerado como un antioxidante natural (Kang y col., 2010).

Por otra parte, en el arroz integral germinado se ha aislado la 7-octadecenil-10'-henicosadienil cetona, sustancia con una marcada potencia inhibidora de la actividad de prolilendopeptidasa y que podría emplearse como parte de terapias preventivas de desórdenes mentales como la amnesia y el alzhéimer (Kayahara, 2000).

2.4. Consumo de arroz y nuevas tendencias

Actualmente, se conocen tres modelos de consumo de arroz: el modelo asiático, con una media de consumo anual superior a 80 kg por persona; el modelo de países subtropicales en desarrollo, con un consumo de entre 30 y 60 kg por persona; y el modelo Occidental, con un consumo de arroz menor de 10 kg por persona. En particular, Ecuador es uno de los mayores consumidores de arroz en América Latina, ocupando el cuarto lugar detrás de Surinam, Guayana y Perú, con un consumo de 50,46 kg por persona en 2013 (Alonço, 2005; INEC, 2014). Si bien es cierto que los hábitos alimenticios de la población ecuatoriana han cambiado en los últimos años, aún se mantiene la cultura arrocería, consumiendo este cereal todos los días del año y en prácticamente todas las comidas.

El arroz es principalmente consumido como arroz blanco, en el que los minerales, vitaminas, la fibra, compuestos fenólicos y parte de la proteína se pierden durante el proceso de descascarillado y pulido. Según su nivel de consumo, el arroz blanco puede

representar hasta el 27% de la ingesta de energía por su elevado contenido de almidón. Estudios observacionales y epidemiológicos han encontrado una asociación significativa entre el consumo de arroz blanco en países desarrollados y el aumento del riesgo de padecer diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y obesidad (Soriguer y col.). En contraposición, el consumo de cereales integrales, se asocia con un menor riesgo de padecer ciertas enfermedades y desordenes metabólicos (Zhang y col., 2010) lo que se ha atribuido a su composición nutricional y en compuestos bioactivos. Estas evidencias científicas han comenzado a modificar las tendencias de consumo de arroz. Por un lado, en los países desarrollados el consumo de arroz blanco está sufriendo un ligero descenso en favor del consumo de productos a base de cereales integrales que se perciben como más saludables. Esta tendencia está empujando a la industria hacia la innovación y desarrollo de nuevos productos derivados del arroz. Por otro lado, en los países en vías de desarrollo, el arroz blanco contribuye con el 20% a la ingesta de proteína (Macleán y col., 2002), sin embargo, debido a su perfil incompleto de aminoácidos y su bajo contenido de micronutrientes, su consumo como alimento básico puede producir malnutrición. Los individuos intolerantes al gluten también tienden a la malnutrición, ya que al tener la mucosa intestinal dañada, se ve reducida su capacidad de absorción de nutrientes. A esto se le suma que la mayoría de los productos sin gluten se elaboran a partir de arroz blanco que, como ya se ha mencionado es pobre en micronutrientes, lo que aumenta el riesgo de deficiencias nutricionales. Para resolver este problema se han desarrollado diferentes estrategias de biofortificación del arroz que pueden ir desde la mejora genética de variedades hasta la adición de minerales específicos durante el procesado. En este último caso, la fortificación puede afectar a la calidad sensorial del producto final y, por tanto, es necesario prestar atención a la forma y cantidad de los compuestos añadidos.

En este contexto, el arroz integral se perfila como una alternativa al arroz blanco para paliar la malnutrición y el riesgo de padecer enfermedades crónicas por su mayor contenido en nutrientes y en compuestos bioactivos (fibra, proteína, vitaminas E y B, minerales, GABA, compuestos fenólicos, etc). Los beneficios sobre la salud y el importante valor nutricional que supone el consumo de arroz integral han llamado la atención de autoridades de gobierno, empresarios e investigadores a fin de desarrollar estrategias que permitan aprovechar este recurso y lograr potenciar aún más sus

cualidades. Sin embargo, a pesar de sus beneficios nutricionales el consumo de arroz integral no es muy elevado debido, principalmente, a sus largos tiempos de cocción y la menor aceptación de su palatabilidad por parte de los consumidores. La industria alimenticia ha enfocado esfuerzos buscando alternativas que permitan aprovechar y mejorar el potencial de los granos de arroz integral y, además, crear nuevos productos a partir de éste. Por esta razón, la germinación del arroz integral surge como una propuesta efectiva de biofortificación nutricional del arroz integral que mejora sus características sensoriales y permite el desarrollo de nuevos productos con valor añadido (El-Adawy y col., 2003; Wu y col., 2011; Donkor y col., 2012). En Japón, el arroz integral germinado salió al mercado en 1995. Desde entonces su popularidad ha crecido en la población japonesa y numerosas industrias productoras han surgido en el país.

2.5. Biofortificación del arroz integral mediante la germinación

El proceso de germinación se presenta como una estrategia económica efectiva de biofortificación del arroz integral que, junto con la mejora de su palatabilidad, produce los cambios necesarios en sus constituyentes para el crecimiento de la nueva planta. Las transformaciones que suceden en la semilla no sólo dependen de las condiciones externas a las que se somete al grano de arroz para provocar su crecimiento, sino también a las características genéticas propias de cada semilla y a su capacidad de respuesta a factores como la resistencia a la dormancia y su acondicionamiento antes de la germinación (Baskin y Baskin, 2014).

El proceso de germinación comprende tres fases: imbibición, activación y crecimiento post-germinación. En la bibliografía, se distingue entre arroz pre-germinado y germinado dependiendo del grado de germinación al que se somete el arroz. El primero de ellos se obtiene dejando transcurrir las fases de remojo y activación mientras que en el arroz germinado se dan todas las fases de germinación.

En la **fase de imbibición**, se produce una rápida absorción de agua durante las primeras 18 h y, en consecuencia, aumenta el contenido de agua en el grano de arroz entre un 25% y 35% (Yoshida, 1981). Aunque la absorción de agua es independiente de la temperatura, el contenido de agua en la semilla sí está influenciado por la temperatura (Figura 12).

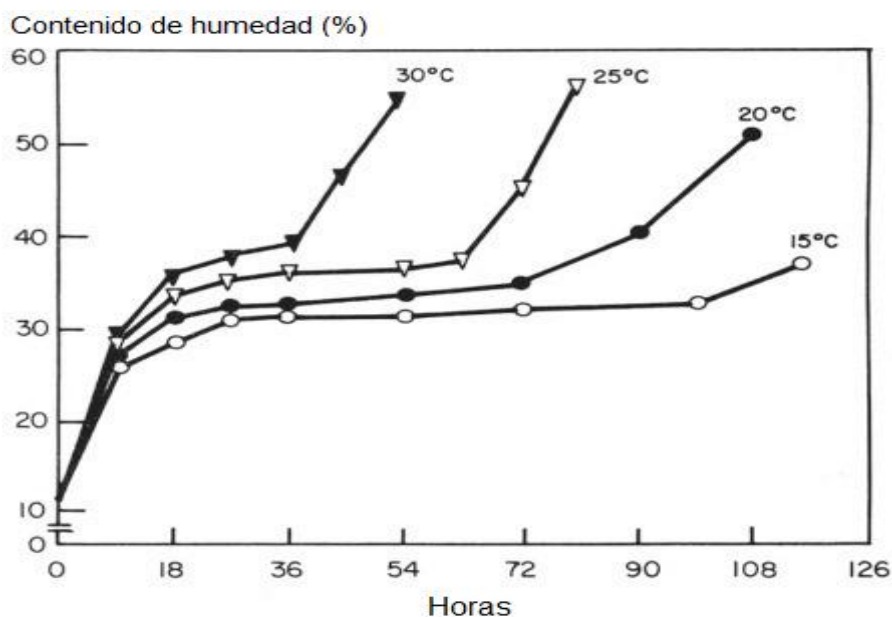


Figura 12. Cinética de absorción de agua de la semilla de arroz a diferentes temperaturas.

Esta fase se considera crítica en la germinación del arroz ya que determina el comienzo de la fase de activación y puede dar lugar a ligeros cambios en la composición nutricional del arroz como una ligera reducción de vitaminas, minerales y ácido fítico debido a su solubilización y posterior lixiviación en el agua de remojo (Fernández, 2006; Moongngarm y Saetung, 2010).

En la **fase de activación** la absorción de agua por parte de la semilla es insignificante. La duración de esta fase es dependiente de la temperatura, alargándose considerablemente con temperaturas bajas (Figura 12). La activación del metabolismo en el arroz integral da lugar a grandes cambios fisiológicos y bioquímicos que incluyen la producción de enzimas amilolíticas, proteolíticas y lipasas (Kayahara, 2000) responsables del aumento de azúcares simples, aminoácidos y péptidos (Moongngarm, 2013; Zhang y col., 2014), así como de ácidos grasos (Shu y col., 2008). Estos productos de hidrólisis son más biodisponibles y modifican las propiedades organolépticas del arroz integral (Charoenthaikij y col., 2010; Wu y col., 2013). En esta fase también se ha observado la reducción de antinutrientes como el ácido fítico como consecuencia de la activación de fitasas con el consiguiente aumento de la biodisponibilidad de minerales (Ohtsubo y col., 2005; Roohinejad y col., 2010). A parte de los cambios nutricionales, las actividades bioquímicas que ocurren durante la fase de activación también generan compuestos

bioactivos como el GABA, tocoferoles, tocotrienoles, γ -orizanol y compuestos fenólicos (Ohtsubo y col., 2005; Roohinejad y col., 2010). El aumento de GABA en el arroz integral pre-germinado (Roohinejad y col., 2011) se debe a la activación de la GAD (Komatsuzaki y col., 2007). Se ha descrito que durante la pre-germinación se activan las enzimas responsables de la síntesis de compuestos fenólicos y diferentes carbohidratasas y esterasas que hidrolizan las paredes celulares del arroz integral y enlaces tipo éster, respectivamente, liberando los ácidos fenólicos que se encuentran unidos a esas estructuras vegetales. En consecuencia, el arroz pre-germinado presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante (Kaukovirta-Norja y col., 2004). El aumento del contenido de vitamina E observado en varios cereales (Kim y col., 2012; Wang y col., 2014; Žilić y col., 2014), se debe principalmente a la síntesis de tocoferoles y tocotrienoles (Moongngarm y Saetung, 2010) y a la liberación de homólogos de la vitamina E unidos a componentes de la pared celular (Ng y col., 2013).

La activación y expresión de enzimas hidrolíticas en la fase de activación está enormemente influenciada por la variedad de arroz integral y las condiciones de la fase de remojo (tiempo, disponibilidad de oxígeno, temperatura). Por tanto, la selección de variedades y modificación de las condiciones de remojo es de gran interés para maximizar el valor nutricional y funcional del arroz integral pre-germinado. Con este propósito, diversas investigaciones han propuesto la adición al agua de remojo de elicitores (Zhang y col., 2014), modificación del pH del agua (Ou y col., 2011), temperatura (Ng y col., 2013) y disponibilidad de oxígeno (Ding y col., 2015), la presencia o ausencia de luz (Yoshida, 1981).

En la **fase de post-germinación** comienza el crecimiento del coleóptilo y la radícula. La temperatura en esta fase afecta a la tasa de crecimiento del brote pero no a la eficiencia de crecimiento. Es en esta fase es donde se suceden los mayores cambios en los constituyentes del arroz (Wang y col., 2015). Entre 22 °C y 31 °C la tasa de crecimiento aumenta linealmente, y los nutrientes de reserva (almidón, proteínas y lípidos) y el ácido fítico continúan degradándose para producir azúcares simples (Ayernor y Ocloo, 2007; Mohan y col., 2010), aminoácidos (Veluppillai y col., 2009) y ácidos grasos (Shu y col., 2008) y fósforo para utilizarse en el crecimiento del brote. Por otro lado, continúa la síntesis o liberación de proteínas (Mohan y col., 2010), polisacáridos (Oh y

col., 2010), GABA (Oh, 2003; Oh y Oh, 2004), vitaminas E, C y grupo B (Moongngarm y Saetung, 2010), compuestos fenólicos (Ti y col., 2014) y γ -orizanol (Oh y col., 2010; Kim y col., 2015). La extensión de la mejora del valor nutricional y funcional del arroz integral germinado dependen de la variedad y las condiciones de germinación en esta fase (Yang y col., 2001; Ng y col., 2013). Por tanto, es necesario la optimización de la temperatura, tiempo e iluminación para obtener el máximo valor nutricional y contenido de compuestos bioactivos en el arroz integral germinado.

2.6. Beneficios saludables del arroz integral pre-germinado y germinado

Los cambios descritos en la composición nutricional y fitoquímica del grano de arroz integral pre-germinado y germinado parecen estar detrás de los beneficios observados tras su consumo, especialmente relacionados con la disminución de los factores de riesgo relacionados con las enfermedades cardiovasculares, el control y prevención de la diabetes mellitus y la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Tabla 6).

Tabla 6. Estudios *in vivo* sobre el efecto beneficioso en la salud del arroz integral pre-germinado y germinado

Modelos de estudio	Dieta y dosis	Duración	Principales funciones fisiológicas saludables	Referencia bibliográfica
Ratones C57BL/6J con hiperglicemia inducida	Arroz integral pre-germinado como fuente de carbohidratos. Ad libitum	16 semanas	Regulación de la presión sanguínea. Reducción de glucosa en sangre y de la hemoglobina glicosilada.	(Shen y col., 2015)
Mujeres asiáticas con diabetes tipo II y con índice de masa corporal bajo (23)	Sustitución del arroz blanco por arroz integral pre-germinado como alimento básico	4 meses	Reducción de la concentración de glucosa en sangre, mejora del perfil de lípidos plasmáticos y la presión arterial	(Bui y col., 2014)
Ratas Sprague-Dawley con hipercolesterolemia inducida	50% de dieta basal con arroz integral pre-germinado. Ad libitum	8 semanas	Modulación de los niveles de colesterol en sangre	(Roohinejad y col., 2009)
Ratas espontáneamente hipertensas (SHRs)	Dieta con 40% de arroz integral pre-germinado	8 semanas	Control de la presión sanguínea y disminución del colesterol sérico	(Ebizuka et al., 2009)
Individuos sanos	Arroz integral pre-germinado 50 g/ día	2 semanas	Control de glucosa postpandrial	(Ito y col., 2005)
Ratas Wistar	Arroz integral pre-germinado. Ad libitum	9 días	Reducción de glucosa e insulina en sangre y resistencia a la insulina	(Seki y col., 2005)
Ratones machos ICR con déficit de aprendizaje y memoria inducida	39,7 % de la dieta con arroz pre-germinado. Ad libitum	2 semanas	Mejora del aprendizaje espacial	(Mamiya y col., 2008)

Conejos machos con hiperlipidemia inducida	19,5 % de la dieta con arroz integral germinado. Ad libitum	10 semanas	Mejora la actividad antioxidante de las enzimas hepáticas, y previene placas ateroscleróticas. Reduce la peroxidación lipídica	(Mohd. Esa y col., 2013)
Conejos machos con hipercolesterolemia inducida	19,5 % de la dieta con arroz integral pre-germinado. Ad libitum	10 semanas	Mejora del perfil lipídico en sangre	(Esa y col., 2008)
Ratas Sprague-Dawley con diabetes tipo 2 inducida	50% y 100% de la dieta con arroz integral germinado	4 semanas	Supresión de genes glucogénicos (Fbp1 y Pck1). Control de azúcar en sangre	(Imam y Ismail, 2013)
Individuos con diabetes tipo 2 y alteraciones de los niveles de glucosa en ayunas	Arroz integral germinado como alimento básico 180 g, 3 veces al día.	6 semanas	Mejora de glucosa y de lípidos plasmáticos	(Hsu y col., 2008).

Entre los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares se incluye la hipercolesterolémica y la hipertensión. El consumo de arroz integral pre-germinado y germinado ha demostrado ser efectivo en la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares mediante la disminución de la tensión sanguínea (Shen y col., 2015; Bui y col., 2014), mejora del perfil de lípidos en sangre (Bui et al., 2014; Roohinejad et al., 2009; Ebizuca et al., 2009; Hsu y col., 2008; Esa y col., 2008), inducción de enzimas antioxidantes hepáticas, inhibición de la peroxidación lipídica y prevención de la formación de placas de ateroma (Mohd. Esa y col., 2013). Estos efectos se han atribuido a la acción sinérgica de varios constituyentes presentes en el arroz integral pre-germinado y germinado como la fibra alimentaria, GABA, polifenoles y γ -orizanol (Fardet, 2010).

Por otra parte, estudios en animales y en individuos sanos o con diabetes han concluido que el consumo de arroz integral pre-germinado o germinado tiene un efecto positivo en el control del nivel de glucosa en la sangre (Imam y Ismail, 2013) mediante la supresión de la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis (Imam y Ismail, 2013) y la mejora de la resistencia a la insulina (Seki y col., 2005). Este efecto se debe a la sinergia entre los diferentes componentes bioactivos como γ -orizanol, ácidos fenólicos y flavonoles, GABA, fibra alimentaria y otros antioxidantes cuyo contenido y composición están notablemente mejorados comparativamente con el arroz integral sin germinar (Fardet, 2010; Imam y col., 2012; Imam y Ismail, 2013).

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa incurable que produce trastornos cognitivos y de conducta importantes. El péptido β -amiloide (PBA) parece ser el principal componente de las placas seniles y causante de las lesiones oxidativas (Butterfield y Pocernich, 2003). Además, es neurotóxico, inhibe aspectos del sistema glutamatérgico aumentando la presencia extra neuronal de glutamato e incrementando los niveles de calcio intracelular, conduciendo a la muerte celular. Se ha observado que el ácido ferúlico, posiblemente por su efecto antiinflamatorio, protege de la neurotoxicidad del PBA a las células (Wu y col., 2012) y, junto con otros antioxidantes presentes en mayor cantidad en el arroz integral germinado, reduce el riesgo de estrés oxidativo (Mamiya y col., 2008). Soi-ampornkul y col. (2012) han demostrado el efecto positivo en ratones que ingerían arroz integral germinado por lo que se podría pensar que dicho consumo en humanos podría ayudar a prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Adicionalmente, en pacientes con la enfermedad de Alzheimer se han encontrado niveles bajos de GABA, por lo que la administración de germen de arroz con 26,4 mg de GABA ha demostrado ser efectivo en su tratamiento (Diana y col., 2014).

2.7. Desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales derivados del arroz integral germinado

El arroz integral germinado ofrece características nutricionales y funcionales importantes, por lo que el desarrollo de productos a partir de ellos resulta claramente interesante para poder ofrecer alimentos con beneficios para la salud.

En los mercados asiáticos donde el consumo de productos derivados del arroz marca una gran diferencia, se comercializa desde hace años arroz integral germinado. En Japón, con apoyo gubernamental, se elaboran dietas escolares con pan de arroz y, de esta forma, contribuir a mejorar la salud de la población (Ito, 2004).

Se ha tratado de elaborar harinas a partir de arroz integral germinado y utilizarlas para reemplazar la harina de trigo en productos como fideos, galletas e, incluso, pan. Sin embargo, aunque nutricionalmente son productos muy adecuados, existen ciertos problemas aún sin resolver. En la elaboración de galletas y fideos el uso de harina de arroz integral germinado ofrece mayor resistencia a la pérdida de humedad y mejora su suavidad, por lo que usar harina de arroz integral germinado tratada con vapor ha demostrado ser una buena alternativa para reemplazar a la harina de trigo, ofreciendo una mejora del valor nutricional y de la calidad (Chung y col., 2012; Chung y col., 2014). En cambio, el uso de harina de arroz integral germinado sin tratar con vapor en fideos producía pérdidas de peso en la cocción y pérdida de suavidad en el producto final. En ambos alimentos, se observó un color oscuro debido a la reacción de Maillard sucedida por el mayor contenido de azúcares reductores del arroz integral germinado (Chung y col., 2012).

En la elaboración de pan con sustitución parcial del trigo por harina de arroz integral germinado hasta un 50%, se observó que, aunque cambiaba la viscosidad de la masa del pan, no se encontraron diferencias en el análisis sensorial. Además, se presentó como un alimento más saludable por su mayor contenido en GABA y fibra alimentaria (Charoenthaikij y col., 2009).

INTERES Y OBJETIVOS

3. Interés y Objetivos

El arroz blanco es la principal fuente de carbohidratos y energía en la dieta de millones de personas, sin embargo, pierde valor nutritivo y compuestos bioactivos como consecuencia de los procesos de descascarillado y pulido. Por el contrario, el arroz integral, provisto del salvado, germen y endospermo es rico en fibra, proteínas, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos (polifenoles, γ -orizanol, tocoferoles). Numerosos estudios de intervención han observado una asociación significativa entre el consumo de arroz integral y la reducción de los factores de riesgo de ciertas enfermedades crónicas y estos efectos son atribuidos a su contenido en compuestos bioactivos.

La composición nutricional y fitoquímica del arroz está influenciada por la genética de la planta. Por esta razón, existe un gran interés en la selección y mejora genética de variedades de arroz con un valor nutricional y nutracéutico superior a las variedades tradicionales. La mejora genética y la adaptación a las condiciones edafoclimáticas de distintas variedades de arroz ecuatoriano ha permitido incrementar su producción en el país, dando lugar a excedentes, que siendo exportables, aún gran parte permanece en el país, dando como resultado precios bajos para el productor y centros de acopio saturados. Una posible solución a este problema sería aprovechar este recurso como materia prima local para desarrollar nuevos productos con valor añadido que permita ofrecer alternativas de consumo distintas y más saludables.

A pesar de las ventajas nutricionales y beneficios para la salud que ofrece el arroz integral, su consumo es muy limitado sobre todo en los países en vías de desarrollo debido a su particular textura, sabor y largos tiempos de cocción. La germinación, además de suponer una solución a estas limitaciones, permite enriquecer el arroz en fitoquímicos y mejorar la biodisponibilidad de sus nutrientes. Los procesos bioquímicos y el metabolismo responsables de la acumulación de fitoquímicos durante la germinación del arroz dependen de las condiciones ambientales en las que transcurre el proceso. Por tanto, la aplicación de estreses como la luz y la optimización de parámetros como el tiempo y la temperatura durante el proceso de germinación son estrategias de gran interés para potenciar el valor nutritivo y las propiedades saludables del arroz integral.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la **hipótesis de partida** fue que la combinación de estrategias como la selección de variedades, la aplicación de luz visible desde la fase de pre-germinación y la optimización de la temperatura y el tiempo de germinación podría mejorar la calidad nutricional, compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes del arroz integral ecuatoriano. Además, la aplicación de la harina de arroz integral germinado en procesos de panificación permitiría obtener panes sin gluten, más saludables y de mayor calidad nutricional.

A partir de esta hipótesis de partida, el **objetivo general** de la presente tesis doctoral fue seleccionar variedades de arroz ecuatoriano y optimizar las condiciones de germinación para maximizar el valor nutritivo, contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante del arroz integral. Además, al ser el arroz un cereal libre de gluten y, por tanto, recomendable para celíacos, nos propusimos utilizar la harina de arroz integral germinado para el desarrollo de un pan de arroz integral saludable que pueda ser consumido también por este grupo de la población.

Para alcanzar el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar el impacto de distintas condiciones de germinación sobre la composición proximal y el valor nutricional de distintas variedades de arroz integral ecuatoriano.
2. Optimizar las condiciones de germinación (temperatura y tiempo) para maximizar el contenido de ácido γ -aminobutírico (GABA), compuestos fenólicos y actividad antioxidante de distintas variedades de arroz integral ecuatoriano.
3. Estudiar el efecto de la aplicación de luz visible en las fases de pre-germinación y germinación en la acumulación de GABA y γ -orizanol.
4. Estudiar el efecto de la germinación sobre los beneficios nutricionales, contenido en compuestos bioactivos y actividad antioxidantes de pan elaborado con harina de arroz integral germinado.

RESULTADOS

4. Resultados

En base a los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral, los resultados se han recogido en tres trabajos de investigación publicados en revistas científicas incluidas en el Science Citation Index (SCI) y una solicitud de patente protegida.

4.1. Efecto de las condiciones de germinación en el valor nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de distintas variedades de arroz integral

Como se ha descrito anteriormente, una dieta rica en cereales integrales puede contribuir a prevenir la malnutrición y reducir el riesgo a desarrollar ciertas enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2, entre otras (Belobrajdic y Bird, 2013). Estos efectos beneficiosos son atribuidos a los constituyentes de los granos de cereal integral como la fibra, los minerales, las vitaminas y los fitoquímicos. En el caso del arroz integral, los polifenoles, el γ -orizanol y el GABA son los metabolitos secundarios más importantes (Yu, 2012). Numerosas evidencias científicas indican que estos compuestos actúan como antioxidantes, antihipertensivos, antidiabéticos, anticancerígenos, antiateroscleróticos y, por tanto, tienen el potencial de mitigar múltiples mecanismos implicados en la patogénesis de diversas enfermedades crónicas (Wu y col., 2012; Yu, 2012).

La germinación potencia el valor nutritivo del arroz integral aumentando la biodisponibilidad de las proteínas, el almidón, la fibra, los minerales y las vitaminas (Moongngarm y Saetung, 2010; Imam y Ismail, 2013). Al mismo tiempo, la germinación mejora la calidad organoléptica (Charoenthaikij y col., 2009; Watchararparpaiboon y col., 2010) y propiedades tecno-funcionales del arroz integral diversificando su aplicación en la formulación de alimentos (Xu y col., 2012). No obstante, la intensidad de la respuesta está influenciada por el genotipo, las condiciones del proceso y la interacción entre ambos factores (Lin y Lai, 2011; Megat Rusydi, 2011). Por lo tanto, se consideró relevante llevar a cabo un estudio sistemático para evaluar la influencia de la temperatura (28 y 34 °C) y el tiempo de la germinación (2 y 4 días) en la composición proximal, la fibra alimentaria, el ácido fítico y el grado de proteólisis de distintas variedades de arroz integral (Publicación I). Con el fin de contribuir a dar solución al aprovechamiento de los excedentes de arroz

en Ecuador y la malnutrición en América latina se eligieron variedades de arroz de grano largo desarrolladas y comercializadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP14, INIAP15 e INIAP17), así como un cultivar experimental del mismo Instituto (Go39839) y dos variedades más, desarrolladas y distribuidas por la empresa ecuatoriana INDIA-PRONACA (SLF09 y F50).

Por otro lado, en la bibliografía se recogen diversos estudios en los que se propone la optimización de las condiciones de remojo y germinación como estrategia para mejorar el contenido en fitoquímicos (GABA, compuestos fenólicos o γ -orizanol) en distintas variedades de arroz integral asiáticas. Estos trabajos tienen la limitación de llevar a cabo procedimientos de optimización en los que las variables se ensayan individualmente (Veluppillai y col., 2009). Dichas aproximaciones experimentales son más costosas e ineficientes, además de no llegar a identificar las verdaderas condiciones óptimas del proceso por no tener en cuenta las interacciones entre variables. Era importante, por tanto, optimizar las condiciones de germinación utilizando modelos de superficie de respuesta con un diseño experimental factorial 3^2 . Esta metodología presenta la ventaja de tener en cuenta la interrelación entre variables, además de ser más eficiente y precisa a la hora de identificar las condiciones óptimas del proceso (Giovanni, 1983). Así, se procedió a maximizar el contenido de GABA, compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de las variedades INIAP14, INIAP15 e INIAP17 y del cultivar experimental Go39839 mediante la optimización de la germinación utilizando modelos matemáticos empíricos que permitieron deducir el comportamiento de estos compuestos, a través de la relaciones de las variables tiempo y temperatura de germinación (Publicación II).

En la bibliografía, diversos estudios han demostrado la efectividad de la aplicación de estreses físicos o químicos durante la germinación como estrategia para aumentar el contenido de fitoquímicos en distintos germinados vegetales (Baenas y col., 2014; Świeca y Baraniak, 2014; Świeca y col., 2014). En el caso concreto del arroz integral, se ha encontrado que la aplicación de soluciones de ácido glutámico y giberelinas (Zhang y col., 2014), soluciones acuosas con pH ácido (Zhang y col., 2014) y electrolitos oxidantes (Kim et al. 2015), condiciones de hipoxia (Yang et al., 2015) y estrés térmico (Naiyar et al. 2014) en las fases de remojo y germinación aumentan notablemente los niveles de GABA en el arroz integral. Por otro lado, la radiación UV-B y la irradiación de luz continuada se

han utilizado en el arroz integral para favorecer la acumulación de compuestos fenólicos en los germinados (de Almeida y col., 2013); sin embargo, aún no se conoce el efecto de la irradiación en la acumulación de GABA y de γ -orizanol. En este sentido, nos planteamos realizar un estudio sobre el efecto de la aplicación continuada de luz (20.000 lux), desde la fase de pre-germinación, en la acumulación de GABA y γ -orizanol en los germinados de arroz integral. Estos resultados dieron lugar a la presentación de una patente de invención de procedimiento y producto, que permite conseguir germinados de arroz integral enriquecidos en GABA y γ -orizanol (Patente).

A continuación se presentan los resultados de este estudio en dos publicaciones y una solicitud de patente de invención:

Publicación I. Evaluación sobre la composición proximal, fibra alimentaria, ácido fólico y la hidrólisis proteica del arroz integral ecuatoriano germinado.

Publicación II. Maximización del contenido fitoquímico y de la actividad antioxidante de los brotes de arroz integral ecuatoriano a través de las condiciones óptimas de germinación.

Patente. Procedimiento de obtención de granos de arroz integral germinado y productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos.

Publicación I. Evaluación sobre la composición proximal, fibra alimentaria, ácido fítico y la hidrólisis proteica del arroz integral ecuatoriano germinado.

Patricio J. Cáceres, Cristina Martínez-Villaluenga, Lourdes Amigo, Juana Frias. Assessment on proximate composition, dietary fiber, phytic acid and protein hydrolysis of germinated ecuadorian brown rice. Plant Foods for Human Nutrition, 2014, 69(3): 261-267.

Resumen

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el arroz integral germinado es más saludable y nutritivo que el arroz integral. Dado que la calidad nutritiva del arroz integral germinado depende de la diversidad genética y de las condiciones de germinación, en este trabajo el objetivo fue evaluar el efecto del remojo y la germinación en la composición proximal, las fracciones de fibra alimentaria, el contenido de ácido fítico, así como el grado de proteolisis y péptidos liberados de seis variedades de arroz integral ecuatoriano. Para ello, el arroz se remojó en agua a 28 °C durante 24 h y, posteriormente, se germinó en oscuridad a diferentes temperaturas (28 y 34 °C) y tiempos (48 y 96 h).

El contenido de proteínas, lípidos, cenizas y carbohidratos disponibles osciló entre 7,3-10,4%, 2,0-4,0%, 0,8-1,5% y 71,6-84,0%, respectivamente, en las diferentes variedades de arroz integral germinado. En general, la fibra alimentaria total aumentó significativamente en el arroz integral germinado observándose niveles que oscilaron entre 6,1 y 13,6%, con una elevada proporción de fibra insoluble, mientras que el contenido en ácido fítico se redujo notablemente. En general, la hidrólisis de proteínas durante la germinación fue más acusada a 28 °C y 48 h de germinación. Estos resultados sugieren que el arroz integral germinado puede ser consumido directamente como un alimento básico por la población mundial, contribuyendo a cubrir sus necesidades nutricionales.

Assessment on Proximate Composition, Dietary Fiber, Phytic Acid and Protein Hydrolysis of Germinated Ecuadorian Brown Rice

Patricio J. Cáceres · Cristina Martínez-Villaluenga ·
Lourdes Amigo · Juana Frias

© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Germinated brown rice (GBR) is considered healthier than brown rice (BR) but its nutritive value has been hardly studied. Since nutritive quality of GBR depends on genetic diversity and germination conditions, six Ecuadorian BR varieties were germinated at 28 and 34°C for 48 and 96 h in darkness and proximate composition, dietary fiber fractions, phytic acid content as well as degree of protein hydrolysis and peptide content were studied. Protein, lipids, ash and available carbohydrate ranged 7.3–10.4 %, 2.0–4.0 %, 0.8–1.5 % and 71.6 to 84.0 %, respectively, in GBR seedlings. Total dietary fiber increased during germination (6.1–13.6 %), with a large proportion of insoluble fraction, while phytic acid was reduced noticeably. In general, protein hydrolysis occurred during germination was more accused at 28°C for 48 h. These results suggest that GBR can be consumed directly as nutritive staple food for a large population worldwide contributing to their nutritional requirements.

Keywords Brown rice · Germination · Proximate composition · Dietary fiber · Phytic acid · Protein hydrolysis

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is the most important staple food in many Asian and South American countries, but its

consumption is widespread all over the world providing the energy and proteins over half the world's population. Rice production has grown steadily in recent years, expecting to achieve a world production of 512 million tons by 2016 [1]. In Ecuador, rice is the main energy provider since it is the primary component of the main day course. Different varieties of long grain rice supplied by the Ecuadorian government and private enterprises are provided and farmland has recently met local demand to overproduction [2]. BR contributes not only with the basic nutrients of polished rice but also with bioactive compounds and antioxidants that are concentrated in the bran, being particularly rich in linoleic acid, γ -aminobutyric acid, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol and phenolic compounds, as well as functional proteins, unsaponifiables lipids and dietary fiber that make BR attractive beyond its nutritional quality [3].

The interest of soaking and germination of BR is enormously increasing nowadays, since it is being demonstrated that the health benefits of BR are enhanced with germination [4]. It has been recently shown that germinated brown rice (GBR) exerts chemopreventive and immunomodulatory activity [5], suppresses inflammatory responses [6], inhibits adipogenesis [7] and attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress [8].

Germination starts with a short soaking or steeping process in water where grain rouse from dormancy. During water uptake, the dry seeds restore their metabolic activities leading to biochemical, nutritional and sensorial changes. Seed germination is promoted by the regulation of different proteins involved in storage reserve degradation, biosynthesis of germination-promoting hormones, detoxification and defense and reinforcement of cell walls [9]. Germination results in increased reducing sugars, reduced amylose and starch granules became smaller and less homogeneous [10]. Grain storage proteins are partially hydrolyzed to peptides and amino acids improving protein digestibility and technofunctional properties [11]. Soaking and germination

P. J. Cáceres
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo
Galindo Velasco, km 30, 5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador

P. J. Cáceres · C. Martínez-Villaluenga · J. Frias (✉)
Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC),
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain
e-mail: frias@ictan.csic.es

L. Amigo
Institute of Food Science Research, CIAL (CSIC-UAM), Nicolás
Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

process lead to reduced phytic acid content [12] that results in a higher mineral bioaccessibility [13, 14]. Likewise, dietary fiber (DF) content increases [15] and the substantial higher content of insoluble fiber can provide potential benefits in the prevention of diabetic vascular complications [16].

Recent studies have shown the bioactive compound enhancement during BR germination [14, 17] and its effect on human health [4]. However, to our knowledge, there are no systematic studies addressing the effect of different germination conditions on proximate composition and related nutritive attributes in different BR varieties. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of different germination conditions on proximate composition, dietary fiber and phytic acid content, as well as the protein hydrolysis and peptide content in different Ecuadorian BR varieties. The results will identify germination conditions with higher nutritive potential and will contribute to expand food compositional database showing GBR as an excellent nutritive food for improving the health status of the population worldwide.

Materials and Methods

Plant Materials

Experimental BR cultivar GO39839 (coded GO) and three commercial varieties INIAP 14, INIAP 15 and INIAP 17 (coded 14, 15 and 17) were provided by the National Autonomous Institute of Agricultural Research from Ecuador (INIAP, Ecuador), whilst commercial BR varieties SLF09 and F50 (coded 09 and 50) were supplied by a food processor (Procesadora Nacional de Alimentos C.A., INDIA-PRONACA). All varieties were grown in the coast area of Ecuador (Guayaquil) and showed particular features such as long grain and translucent center.

Sample Preparation

Germination processes were carried out as described previously [17]. Briefly, 50 g of BR grains were firstly washed in 0.1 % (v/v) sodium hypochlorite and then imbibed in deionized water (1:5, w/v) at 28 °C for 24 h. Subsequently, grains were drained and placed in a germination cabin model EC00-065 (Snijders Scientific, Netherlands) in a relative humidity >90 % for 48 h and 96 h at 28 °C and 34 °C and darkness. Samples were freeze-dried, grounded, and stored in sealed plastic bags under vacuum conditions at 4°C until further analysis. Every germination batch was performed in triplicate.

Determination of Proteins, Fat, Ash, Dietary Fiber and Available Carbohydrates

Nitrogen was determined according to AOAC 984.13 [18] and protein content was calculated using 5.95 as conversion factor. Fat (AOAC 922.06), ash (AOAC 923.03) and soluble, insoluble and total DF (AOAC 985.29, AOAC 991.42 and AOAC 991.43, respectively) were also determined [19]. Available carbohydrates were estimated by difference: $100 - (\% \text{ proteins} + \% \text{ fat} + \% \text{ water} + \% \text{ dietary fibre} + \% \text{ ash})$ [20].

Determination of Phytic Acid

The accurate photometrical Haug and Lantzsch's determination of phytic acid phosphorous was used [21]. Absorbance was read at 540 nm in a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) (BioTek Instruments).

Determination of Degree of Proteolysis and Peptide Content

Degree of proteolysis was determined by the analysis of total and released free amino groups (FAG) in germinated samples. FAG were measured in BR and GBR by addition of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) as previously described [22]. Total FAG were also determined in BR and GBR samples previously hydrolyzed using 6 N HCl for 24 h at 130°C. Degree of proteolysis was calculated as follows: $\text{DH} (\%) = \frac{(\text{FAG in germinated grain} - \text{FAG in raw grain})}{\text{Total FAG}} \times 100$.

Statistical Analysis

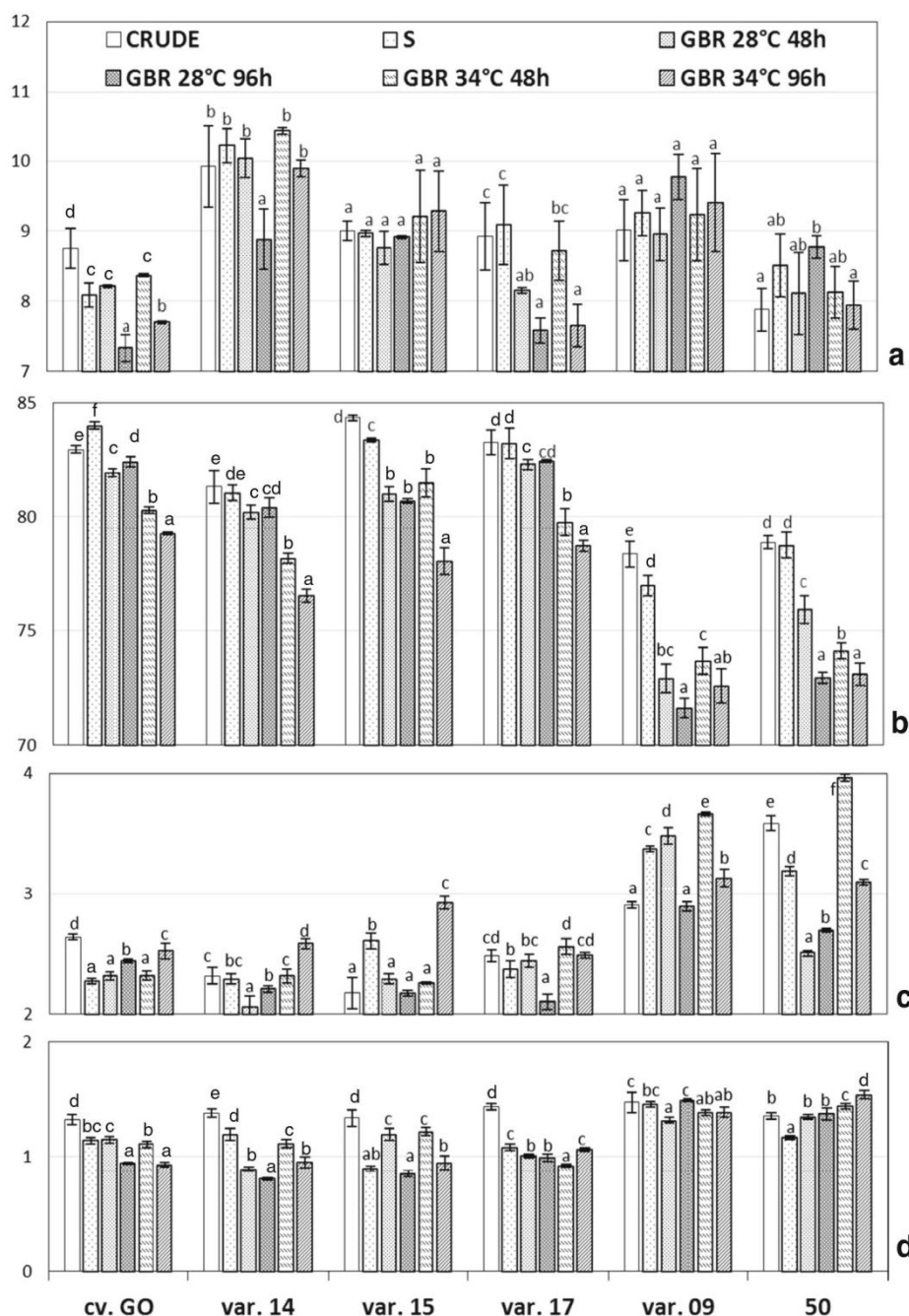
Values are expressed as mean \pm SD from independent germination experiments analyzed in duplicate. ANOVA and Duncan's multiple range comparisons were used to assess differences at confidence level of 95 % ($P \leq 0.05$). Level of significance for temperature and time effects were calculated by statistical-*t* for each component ($P \leq 0.05$) and positive or negative correlations were identified by the regression coefficient sign. Statistical analyses were performed by Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD).

Results and Discussion

Effect of Germination Conditions on the Proximate Composition of BR Varieties

Figure 1 shows the proximate composition of crude, soaked (S) and germinated (GBR) brown rice. In crude grains, protein content ranged from 7.9 to 9.9 % dry matter (d.m.) (Fig. 1a). These values were slightly higher than those previously

Fig. 1 Content of protein (a), available carbohydrates (b), fat (c) and ash (d) of crude, soaked (S) and germinated (GBR) brown rice grains. Bars indicate mean values (g/100 g dry matter) and error lines indicate standard deviations. The same letter indicate no significant difference among mean values within a rice variety ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test)



reported in commercial BR [14, 23]. Differences in BR protein content could be explained by intra-variety genetic diversity, edaphoclimatic conditions and harvesting/storage management. BR soaking (24 h at 28°C) did not affect the protein content with exception of cv. GO (8 % reduction, Fig. 1a). Protein losses during rice soaking have been previously reported [13] and higher temperature led to lower protein content. Germination process affected differently the protein content depending on BR variety. In general, germination did not cause relevant changes in protein content; however,

var. 50 germinated at 28°C for 4 days showed a significant increase (11 %). In general, the largest protein content was observed in GBR var. 14, 15 and 09. BR cv. GO and var. 14 showed a negative correlation for germination time and a positive correlation for temperature ($P \leq 0.05$) and var. 17 showed only a negative correlation for germination time ($P \leq 0.05$). Decreased protein content is related to increased amino acid content as consequence of proteases activation [24]. This effect causes protein solubilization and its further leaching during radicle protrusion [13]. In addition, other studies showed

an increased protein content in germinated seeds attributed to protein biosynthesis during germination, therefore, the protein content depends on the balance between protein degradation and protein biosynthesis during germination [23].

The content of available carbohydrates in crude BR ranged from 78.3 to 84.3 % d.m. (Fig. 1b), results that agree with the literature [14, 23]. BR soaking caused a 10 % increase in the carbohydrates content ($P \leq 0.05$) for cv. GO, while it remained unchanged in var. 14, 17 and 50 and it underwent a slight decrease in var. 15 and 09 ($P \leq 0.05$). Germination brought about a decrease in the available carbohydrate content in all varieties studied. According to statistical analysis, carbohydrates content was negatively affected ($P \leq 0.05$) by both germination time and temperature and only var. 09 showed a negative correlation ($P \leq 0.05$) with germination time. In general, GBR cv. GO and INIAP varieties provided larger available carbohydrates than INDIA-PRONACA ones. Changes in the available carbohydrates can be attributed to the increased activity of endogenous α -amylase during germination [14, 24] causing the hydrolysis of native starch and of the release of reducing sugars that are used as source of energy for the growing seedling [10]. The long-term consumption of GBR in type 2 diabetes patients as staple food was useful in improving blood glucose and lipid levels [25].

Commercial INDIA-PRONACA var. 09 and 50 presented higher lipid content (2.9 and 3.6 % d.m.) than INIAP var. 14, 15 and 17 (2.2–2.5 % d.m.), and cv. GO contained an intermediate lipid value (2.65 % d.m.) (Fig. 1c), values that are consistent with a previous study [26] that found palmitic, oleic and linoleic acids as the major fatty acids (80 %). BR soaking led to a lipid increase in var. 15 and 09 ($P \leq 0.05$) and a noticeable lipid reduction ($P \leq 0.05$) in cv. GO and var. 17 and 50. Consequently, during germination lipid content underwent a different behavior depending on BR variety and germination conditions. Temperature was positively correlated with lipid content ($P \leq 0.05$) in all BR varieties, except for var. 15, while germination time was also positively correlated with lipid content for cv. GO and var. 15, 17 and 50. Decreased lipid content observed after germination has been ascribed to increased lipase activity to generate energy during seedling growth [27]. On the other hand, during germination the biosynthesis of lipids occurs, as it has been described for unsaturated and polyunsaturated fatty acids [23]. In addition, γ -oryzanol is the principal component of unsaponifiable lipid fraction [28] that, along with tocopherols and tocotrienols, contributes to the nutritive quality and health promoting properties associated to GBR [4]. In general, INDIA-PRONACA GBR var. 09 provided larger lipid content than those from INIAP varieties and cv. GO.

Ash content of studied BR varieties ranged from 1.3 to 1.5 % d.m. (Fig. 1d), results that falls within those reported in the literature [14, 23]. Ash content decreased ($P \leq 0.05$) in soaked BR, except of var. 09 where no significant differences were

found. During germination, time and temperature affected ($P \leq 0.05$) ash content and negative correlations were found for cv. GO and INIAP varieties, whilst only germination time affected negatively ($P \leq 0.05$) to INDIA-PRONACA ones. Decreased ash content could be explained by lixiviation losses during soaking and watering, [23], nevertheless GBR still have a considerable amount of ash which reflects its mineral content, being INDIA-PRONACA varieties the ones with the largest ash content.

Effect of Germination on the Contents of Soluble and Insoluble Dietary Fiber

Table 1 shows the content of total dietary fiber (TDF) and their soluble (SDF) and insoluble (IDF) fractions in Ecuadorian crude, soaked (S) and germinated (GBR) brown rice. TDF did not exceed a 5 % d.m. in commercial INIAP var. 14, 15, 17 and cv. GO, whilst INDIA-PRONACA varieties provided around 8 % d.m., and SDF contributed with 72–75 % and 66–68 %, respectively. TDF content depends on BR variety and harvesting conditions [29]. Although the soaking process led to a slight ($P \leq 0.05$) increase of SDF and IDF in some studied BR varieties, the highest increase was observed after germination. SDF and IDF content of INIAP varieties were positively correlated ($P \leq 0.05$) with germination time and temperature and the highest TDF values were obtained for GBR var. 14 and 17 at 34 °C for 96 h (10 g/100 g d.m.). INDIA-PRONACA varieties were positively affected by germination conditions and maximum TDF contents were reached in GBR var. 09 at 28 °C for 48 h and GBR var. 50 at 28 °C for 96 h (13.6 and 13.6 % d.m., respectively). It is noteworthy that GBR var. 15 suffered the largest increase in SDF and IDF during germination at 34 °C for 96 h (from 2.9 to 5.1 and 0.9 to 3.7 % d.m., respectively), although the maximum values were found in var. 09 and 50 (Fig. 2) in which SDF and IDF contributed similarly to TDF content (45–55 %). It has been shown that TDF increases during BR germination [23]. In addition, germination impact on fiber fractions and SDF/IDF ratio depends on the variety and processing conditions [30, 31]. It has been shown that the content of IDF can suppress post-prandial glucose level after intake of soaked BR [16].

Effect of Germination on the Content of Phytic Acid

The content of phytic acid in crude, soaked (S) and germinated (GBR) varieties is collected in Table 2. Levels of phytic acid in crude BR were rather similar (from 1.15 % d.m. in cv. GO to 1.5 % d.m. in var. 15). These results match with previous data found in BR var. Kenjian 90–31 [32] and are lower than those in BR cv. Ilpumbyeo [26]. Phytic acid content decreased ($P \leq 0.05$) after soaking in most Ecuadorian varieties (from 15 % in var. 50 to 48 % in var. 15), whilst no significant differences were observed in BR var. 09. Germination temperature and time negatively correlated with phytic acid

Table 1 Dietary fiber content (g/100 g d.m) in crude, soaked (S) and germinated (GBR) Ecuadorian brown rice

Treatment	Temperature (°C)	Time (h)	cv. GO	var. 14	var. 15	var. 17	var. 09	var. 50
Soluble dietary fiber								
Crude	—	—	3.10±0.11 ^a	3.63±0.08 ^a	2.90±0.19 ^a	3.19±0.05 ^a	5.16±0.09 ^a	4.85±0.16 ^a
S	28	24	3.11±0.18 ^a	3.84±0.13 ^b	3.03±0.07 ^a	3.16±0.13 ^a	5.33±0.06 ^b	4.81±0.13 ^a
GBR	28	48	3.52±0.08 ^b	4.04±0.08 ^c	3.08±0.03 ^{ab}	3.40±0.04 ^b	6.13±0.08 ^c	5.81±0.05 ^b
	28	96	3.71±0.07 ^{bc}	4.30±0.07 ^d	3.29±0.16 ^b	3.49±0.07 ^b	6.39±0.04 ^d	6.53±0.11 ^d
	34	48	3.77±0.11 ^c	4.30±0.08 ^d	3.58±0.19 ^c	3.89±0.07 ^c	6.23±0.03 ^c	6.20±0.06 ^c
	34	96	5.34±0.04 ^d	5.11±0.12 ^c	5.11±0.08 ^d	5.55±0.07 ^d	6.12±0.07 ^c	6.30±0.08 ^c
Insoluble dietary fiber								
Crude	—	—	1.21±0.06 ^a	1.42±0.08 ^a	0.96±0.10 ^a	1.15±0.12 ^a	3.80±0.11 ^a	3.74±0.10 ^a
S	28	24	1.37±0.06 ^b	1.40±0.05 ^a	1.17±0.06 ^a	1.36±0.02 ^b	4.13±0.04 ^b	3.86±0.04 ^a
GBR	28	48	2.85±0.15 ^c	2.75±0.12 ^b	3.09±0.19 ^c	2.78±0.13 ^c	7.47±0.17 ^e	6.78±0.12 ^c
	28	96	3.14±0.11 ^d	3.40±0.10 ^c	3.76±0.11 ^d	3.27±0.14 ^d	7.09±0.08 ^d	7.06±0.07 ^d
	34	48	4.13±0.03 ^c	3.66±0.22 ^d	2.65±0.11 ^b	4.27±0.08 ^c	5.85±0.05 ^c	5.85±0.11 ^b
	34	96	4.26±0.08 ^c	4.94±0.08 ^c	3.70±0.13 ^d	4.50±0.08 ^f	7.02±0.08 ^d	7.18±0.09 ^d

Data are the mean values±standard deviation of three independent experiments ($n=3$). The same superscript indicates no significant difference among mean values within a column ($P\leq 0.05$ according to Duncan's test)

content in all varieties, except for var. 09 in which phytic acid was only affected by germination time ($P\leq 0.05$). Interestingly, the lowest phytic acid content was obtained at 34 °C for 96 h in all Ecuadorian BR varieties where losses between 32 % for var. 09 and 80 % for cv. GO were found. This effect has been attributed to increased endogenous phytase activity that releases phosphorous and lower myoinositol phosphates and, additionally to phytic acid lixiviation and further leaching into water [11]. From the nutritional point of view, phytic acid is associated with the mineral-related deficiency in humans, as well as protein and lipid availability. However, phytic acid could contribute to fight against a variety of cancers, diabetes, atherosclerosis and coronary heart diseases [33].

Effect of Germination on the Degree of Protein Hydrolysis

Figure 2a shows the degree of protein hydrolysis (DH) in soaked (S) and germinated (GBR) brown rice varieties. In general, proteolysis was negligible during soaking. Larger germination time and temperature led to higher proteolysis. The highest DH value (58.5 %) was observed in var. 50 followed by var. 17 (48.9 %) and cv. GO (48.0 %). Most of BR varieties showed a positive correlation between DH and germination time and temperature ($P\leq 0.05$). On the contrary, DH in cv. GO correlated negatively with germination temperature. During germination proteolysis occurred as consequence of increased protease activity that results in the release of peptides and free amino acids [24]. These effects are reported to improve protein digestibility of BR [14]. In order to confirm this fact, peptide content in crude BR and their respective processed grains was obtained (Fig. 2b). Soaking

led to a slight ($P\leq 0.05$) decrease in peptide content, except for var. 17 that showed a significant ($P\leq 0.05$) increase and var. 50, where no significant differences were found. Germination temperature and time affected positively ($P\leq 0.05$) peptide content, except for var. 09 in which germination temperature was negatively correlated with peptide content ($P\leq 0.05$). INDIA-PRONACA var. 09 showed the largest peptide content that can be ascribed to its large protein content (Fig. 1a) and a noticeable DH (Fig. 2a). In this variety the largest peptide content was obtained after 96 h of germination (3.24 and 4.7 g/100 g d.m at 28 and 34°C, respectively). Bioactive peptides may be released as consequence of proteolysis that takes place during seed germination [34]. So far, enzymatic hydrolysis and fermentation are the biotechnological processes explored to produce antioxidant peptides from rice proteins [35], however, no information has been found on rice germination and related bioactive amino acid sequences. Thus, our group is currently performing further research to identify peptides from GBR with biological activities.

Conclusions

This study shows that germination of brown rice is a natural process of improving its nutritional quality; however, the extent of these positive effects depends on BR variety, germination time and temperature. Since germinated brown rice is a promising food choice to form part of healthy and sustainable diets of the population worldwide, cost-effective germination conditions such as 28°C and 48 h are recommended to enhance brown rice nutritional quality attributes.

Fig. 2 Panel a: Degree of hydrolysis (%DH) of soaked (S) and germinated Ecuadorian brown rice for 48 h (48) and 96 h (96). Panel b: Peptide content (g/100 g d.m.) in crude, soaked (S) and germinated (GBR) Ecuadorian brown rice. The same letter indicates no significant difference within a variety ($P \leq 0.05$, according to Duncan's test)

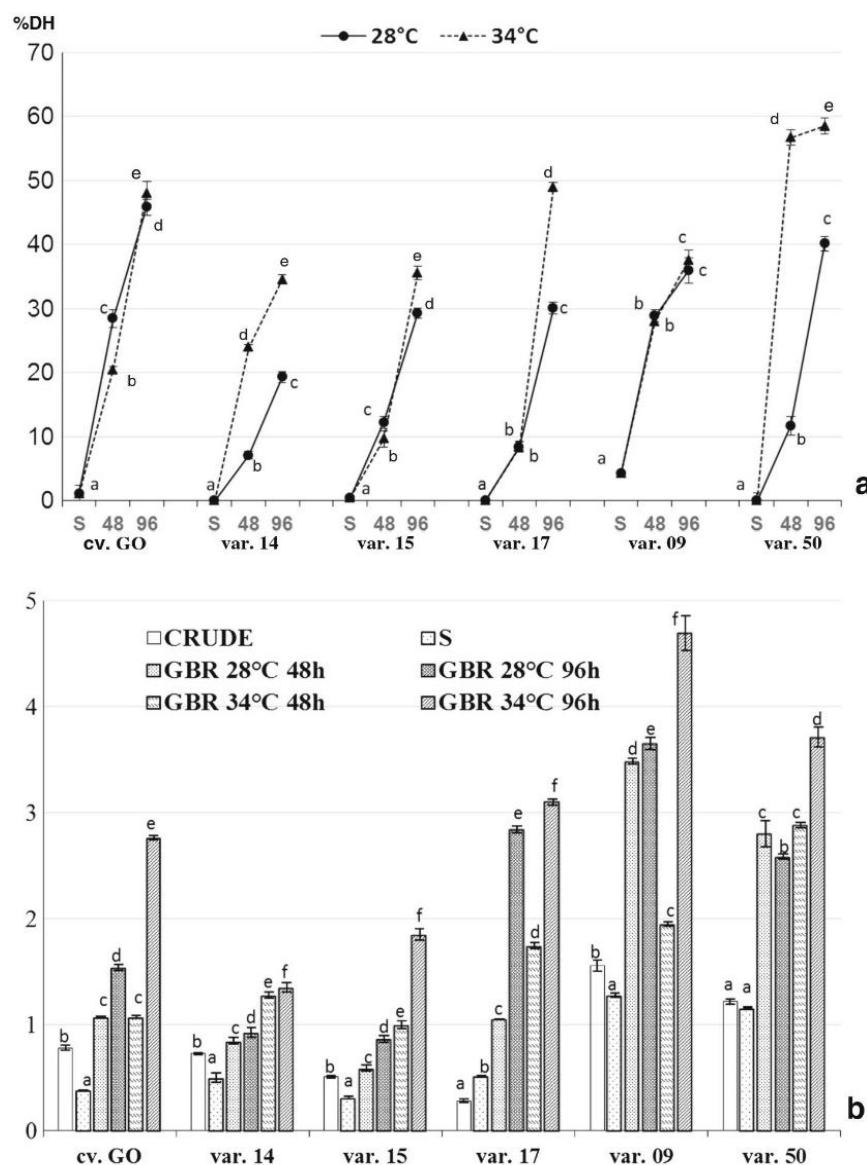


Table 2 Phytic acid content (g/100 g d.m.) in crude, soaked (S) and germinated (GBR) Ecuadorian brown rice

Treatment	Temperature (°C)	Time (h)	cv. GO	var. 14	var. 15	var. 17	var. 09	var. 50
Crude	—	—	1.15±0.02 ^f	1.35±0.06 ^c	1.52±0.04 ^e	1.26±0.0 ^f	1.19±0.04 ^e	1.25±0.05 ^c
S	28	24	0.84±0.02 ^e	0.83±0.03 ^b	0.80±0.06 ^d	0.95±0.03 ^e	1.16±0.03 ^e	1.06±0.03 ^b
GBR	28	48	0.71±0.02 ^d	0.80±0.05 ^b	0.68±0.03 ^c	0.68±0.08 ^d	0.93±0.03 ^c	1.00±0.04 ^b
	28	96	0.51±0.03 ^b	0.50±0.04 ^a	0.56±0.02 ^b	0.33±0.04 ^b	0.86±0.03 ^b	1.04±0.06 ^b
	34	48	0.62±0.02 ^c	0.50±0.04 ^a	0.72±0.05 ^c	0.53±0.06 ^c	1.04±0.04 ^d	1.02±0.03 ^b
	34	96	0.23±0.05 ^a	0.53±0.03 ^a	0.49±0.02 ^a	0.27±0.05 ^a	0.81±0.06 ^a	0.80±0.08 ^a

Data are the mean values±standard deviation of three independent experiments ($n=3$). The same superscript indicates no significant difference among mean values within a column ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test)

Acknowledgments P.J.C. is indebted to the Ecuadorian government through the SENESCYT (Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, Ecuador) support on his doctoral studies. We also acknowledge to INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias of Ecuador) and to INDIA-PRONACA (Productora Nacional de Alimentos C.A.) for providing the BR seeds. We are grateful to M.F. Romero and A. Galarza for their technical assistance. This work was partly funded by AGL2010-16310 Project from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain).

Conflict of Interest Authors declare no conflict of interest

References

1. OECD-FAO Agricultural Outlook 2013–2022 bchsooiqDeoAUGFOS
2. http://agrytec.com/agricola/index.php?option=com_content&view=article&id=7296:magappuso-a-prueba-calidad-semillas-de-arroz-y-maiz&catid=18:noticias&Itemid=57
3. Sharif MK, Butt MS, Anjum FM, Khan SH (2014) Rice bran: a novel functional ingredient. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54:807–816
4. Wu F, Chen H, Yang N, Duan X, Jin Z, Xu X (2013) Germinated brown rice enhances antioxidant activities and immune functions in aged mice. *Cereal Chem* 90(6):601–607
5. Wang SY, Chen CW, Lin YT, Chang CY (2012) Inhibitory effect on human leukemic U937 cell growth and immunomodulatory activity of germinated brown rice. *J Food Drug Anal* 20:699–704+717. doi: 10.6227/jfda.2012200319
6. Park DK, Park HJ (2013) Ethanol extract of androdia camphorata grown on germinated brown rice suppresses inflammatory responses in mice with acute DSS-induced colitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. doi:10.1155/2013/914524, Article number 914524
7. Ho JN, Son ME, Lim WC, Lim ST, Cho HY (2013) Germinated brown rice extract inhibits adipogenesis through the down-regulation of adipogenic genes in 3 T3-L1 adipocytes. *Plant Foods Hum Nutr* 68:274–278
8. Azmi NH, Ismail N, Imam MU, Ismail M (2013) Ethyl acetate extract of germinated brown rice attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of anti-apoptotic, pro-survival and antioxidant genes. *BMC Complement Altern Med* 13:177–188
9. Dogra V, Ahuja PS, Sreenivasulu Y (2013) Change in protein content during seed germination of a high altitude plant *Podophyllum hexandrum* Royle. *J Proteomics* 78:26–38
10. Xu J, Zhang H, Guo X, Qian H (2012) The impact of germination on the characteristics of brown rice flour and starch. *J Sci Food Agric* 92: 380–387
11. El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawey AA, El-Beltagy AE (2003) Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. *Plant Foods Hum Nutr* 58:1–13
12. Chang YP, Tan MP, Lok WL, Pakianathan S, Supramaniam Y (2014) Making use of guava seed (*Psidium guajava* L): the effects of pre-treatments on its chemical composition. *Plant Foods Hum Nutr* 69:43–49
13. Albarracín M, González RJ, Drago SR (2013) Effect of soaking process on nutrient bio-accessibility and phytic acid content of brown rice cultivar. *LWT-Food Sci Technol* 53:76–80. doi:10.1016/j.lwt.2013.01.029
14. Moongngarm A, Saetung N (2010) Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem* 122:782–788
15. Koehler P, Hartmann G, Wieser H, Rychlik M (2007) Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. *J Agric Food Chem* 55:4678–4683
16. Seki T, Nagase R, Torimitsu M, Yanagi M, Ito Y, Kise M, Mizukuchi A, Fujimura N, Hayamizu K, Ariga T (2005) Insoluble fiber is a major constituent responsible for lowering the post-prandial blood glucose concentration in the pre-germinated brown rice. *Biol Pharm Bull* 28: 1539–1541
17. Cáceres PJ, Martínez-Villaluenga C, Amigo L, Frias J (2014) Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chem* 152:407–414
18. AOAC (1990) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Edited by Kenneth Helrich. Virginia 22201, USA
19. AOAC (2000) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th edition. Edited by William Horwitz. Maryland 20877–2417, USA
20. FAO (2002) Food energy – methods of analysis and conversion factors. Food and Nutrition. Paper 77. FAO Rome
21. Reichwald K, Hatzack F (2008) Application of a modified Haug and Lantzsch method for the rapid and accurate photometrical phytate determination in soybean, wheat, and maize meals. *J Agric Food Chem* 56:2888–2891
22. Torino MI, Limon RI, Martínez-Villaluenga C, Makinen S, Pihlanto A, Vidal-Valverde C, Frias J (2013) Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chem* 136: 1030–1037. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.015
23. Megat Rusydi MR, Noraliza CW, Azrina A, Zulkhairi A (2011) Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *Int Food Res J* 18(2):705–713. [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(02\)%202011/\(33\)%20IFRJ-2010-145.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(02)%202011/(33)%20IFRJ-2010-145.pdf)
24. Veluppillai S, Nithyanantharajah K, Vasantharuba S, Balakumar S, Arasaratnam V (2009) Biochemical changes associated with germinating rice grains and germination improvement. *Rice Sci* 16:240–242
25. Hsu TF, Kise M, Wang MF, Ito Y, Yang MD, Aoto H, Yoshihara R, Yokoyama J, Kunii D, Yamamoto S (2008) Effects of pre-germinated brown rice on blood glucose and lipid levels in free-living patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol* 54:163–168
26. Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Woo KS, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee J, Lee YR, Jeong HS (2012) Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. *Food Chem* 134:288–293
27. Hahm TS, Park SJ, Martin Lo Y (2009) Effects of germination on chemical composition and functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Bioresour Technol* 100:1643–1647
28. Raghuram TC, Rukmini C (1995) Nutritional significance of rice bran oil. *Indian J Med Res* 102:241–244
29. Lin PY, Lai HM (2011) Bioactive compounds in rice during grain development. *Food Chem* 127:86–93
30. Martín-Cabrejas MA, Díaz MF, Aguilera Y, Benítez V, Mollá E, Esteban RM (2008) Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chem* 107:1045–1052
31. Ohtsubo K, Suzuki K, Yasui Y, Kasumi T (2005) Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder. *J Food Compos Anal* 18:303–316
32. Liang J, Han BZ, Nout MJR, Hamer RJ (2008) Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and *in vitro* soluble zinc in brown rice. *Food Chem* 110:821–828
33. Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. *Food Chem* 120: 945–959
34. Limón RI, Peñas E, Martínez-Villaluenga C, Frias J (2014) Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT-Food Sci Technol* 56:328–334. doi:10.1016/j.lwt.2013.12.014
35. Dei Piu L, Tassoni A, Serrazanetti DI, Ferri M, Babini E, Tagliazucchi D, Gianotti A (2014) Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food Chem* 155:199–206

Publicación II. Maximización del contenido de fitoquímicos y de la actividad antioxidante de los brotes de arroz integral ecuatoriano a través de la optimización de las condiciones de germinación.

Patricio J. Cáceres, Cristina Martínez-Villaluenga, Lourdes Amigo, Juana Frias. Maximizing the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. Food Chemistry, 2014, 152(0):407–414.

Resumen

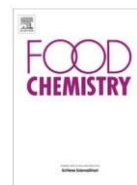
El arroz integral germinado se considera una alternativa saludable al arroz blanco para la prevención de las enfermedades crónicas. La calidad funcional del arroz integral germinado depende del genotipo y de las condiciones de germinación, por tanto, el objetivo de este trabajo fue seleccionar variedades de arroz integral ecuatoriano y tiempos y temperaturas de germinación óptimos para maximizar el contenido de ácido γ -aminobutírico (GABA), compuestos fenólicos totales (TPC) y la actividad antioxidante del arroz integral germinado. Además, se obtuvieron modelos de regresión para predecir la composición fitoquímica y la actividad antioxidante del arroz integral germinado, en los rangos de tiempo y temperatura estudiados.

La germinación en general, mejoró el contenido de GABA y compuestos fenólicos totales, y la actividad antioxidante en todas las variedades de arroz integral. Los niveles máximos de GABA y de actividad antioxidante se alcanzaron a 34°C y 96 h de germinación, mientras que el valor más alto de compuestos fenólicos totales se encontró a 28°C y 96 h de germinación, en todas las semillas. El cultivar Go39839 presentó la actividad antioxidante más alta y la variedad INIAP15 acumuló la mayor cantidad de GABA y de compuestos fenólicos totales en las condiciones óptimas de germinación. Por lo tanto, las variedades Go39839 e INIAP15 permiten obtener un arroz integral más rico en compuestos bioactivos que puede ser de gran interés industrial para la preparación de alimentos saludables que contribuyan a la prevención de enfermedades crónicas.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Review

Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions



Patricio J. Cáceres^{a,b}, Cristina Martínez-Villaluenga^b, Lourdes Amigo^c, Juana Frias^{b,*}

^a Technical High School of the Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo Velasco, km 30, 5 Vía Perimetral, 09-01-5863 Guayaquil, Ecuador

^b Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^c Institute of Food Science Research, CIAL (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2013

Received in revised form 21 October 2013

Accepted 26 November 2013

Available online 4 December 2013

Keywords:

Brown rice

Germination

γ -Aminobutyric acid

Phenolic compounds

Antioxidant activity

Response surface methodology

ABSTRACT

Germinated brown rice (GBR) is considered a healthy alternative to white rice in the fight against chronic diseases. As the functional quality of GBR depends on genotype and germination conditions, the objectives were to identify suitable Ecuadorian brown rice cultivars and optimal germination time and temperature to maximise γ -aminobutyric acid (GABA), total phenolics compounds (TPC) and antioxidant activity of GBR. Regression models for the prediction of phytochemical composition and antioxidant activity in GBR were also obtained. Germination improved GABA, TPC and antioxidant activity in all cultivars. Maximum GABA and antioxidant activity were attained at 34 °C for 96 h, while the highest TPC was found at 28 °C for 96 h in all cultivars. GBR cv. GO displayed the highest antioxidant activity and cv. 15 was the most effective at accumulating GABA and TPC in the optimal germination conditions. Therefore, Ecuadorian GBR could be used for the preparation of functional foods serving as preventative strategies in combating chronic diseases.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	408
2. Material and methods	408
2.1. Plant materials	408
2.2. Chemicals and reagents	408
2.3. Seed germination	408
2.4. Determination of γ -aminobutyric acid	408
2.5. Determination of total phenolic compounds	409
2.6. Determination of antioxidant activity	409
2.7. Statistical analysis	409
3. Results	409
3.1. Germination percentage	409
3.2. Effect of germination time and temperature on GABA content, TPC and antioxidant activity of sprouts from Ecuadorian BR cultivars	410
3.2.1. Effect of germination time and temperature on GABA content	410
3.2.2. Effect of germination time and temperature on TPC	410
3.2.3. Effect of germination time and temperature on antioxidant activity	412
4. Discussion	412
5. Conclusion	413
Acknowledgements	413
References	413

* Corresponding author. Tel.: +34 912587510; fax: +34 915644853.
E-mail address: frias@ictan.csic.es (J. Frias).

1. Introduction

Rice is the most widely consumed cereal grain for a large part of the world's human population. It is the second most produced cereal in the world after maize, (FAOSTAT, 2013). Rice is also the largest crop in Ecuador where long-grain varieties with greater resistance to diseases and pests, high yields and resistance to post-harvest are mostly grown. Ecuadorian rice production is increasing gradually and, although rice is the staple food in this region, there has been an overproduction in 2010, and this overproduction could occur again in the future. Therefore, alternatives that diversify the application of rice in human nutrition and improve its nutritional value are required.

Brown rice (BR) is composed of external thin layers (bran) that enclose the embryo and endosperm. The nutritional components in BR mainly exit in the germ and bran layers which are mostly removed as a consequence of milling or polishing (Monks et al., 2013). For this reason, BR has a higher nutritional quality than polished rice. Recently, human and animal studies have shown that consumption of BR reduces the risk of type-2 diabetes, cardiovascular disease (CVD) and cancer, and these protective health effects have been linked to the presence of bioactive compounds such as polyphenols, GABA, acylated sterol β -glucoside and γ -oryzanol (Zhang et al., 2010; Kim, Kang, Nam, & Friedman, 2012; Goffman & Bergman, 2004).

Germination is a low-cost technology which starts with seed water uptake and ends at the protrusion of radicle from the seed. Reactivation of metabolism occurs during the seed germination process which results in the hydrolysis of storage proteins and carbohydrates and the synthesis/accumulation of metabolites with health-promoting properties. Germination of BR increases the content of γ -aminobutyric acid (GABA) and antioxidants, such as phenolic compounds, γ -oryzanol and vitamin E among other bioactive compounds (Kim, Hwang et al., 2012). GABA exerts a series of health-promoting effects, such as regulation of blood pressure and heart rate, alleviation of pain, anxiety and sleeplessness (Ito, 2004). In addition, GBR extract with enhanced levels of GABA stimulates immune cells (Oh & Oh, 2003) and it inhibits cancer cell proliferation (Oh & Oh, 2004). More recently, studies show that GABA is also a strong secretagogue of insulin in the pancreas and effectively prevents diabetes (Imam, Azmi, Bhanger, Ismail, & Ismail, 2012). Polyphenols have a wide range of biological activities which are linked to their protective effects on oxidative stress-induced diseases as shown in several epidemiological studies (Arts & Hollman, 2005). Recently, Esa, Abdul-Kadir, Amon, and Azlan (2013) have demonstrated that attenuation of oxidative stress by germinated brown rice (GBR) consumption is reached through increases in antioxidant levels in plasma and antioxidant enzyme activity in the liver, thereby, preventing the formation of atherosclerotic plaques in hypercholesterolemic rabbits.

Accumulation of bioactive compounds during BR germination was shown to vary greatly depending on the cultivar, pH, presence of additives and aeration of the soaking solution temperature and time during the phase of water uptake (also known as soaking or steeping), germination and post-germination seedling growth (Watcharaparpai boon, Laohakunjit, & Kerdchoechuen, 2010). These facts clearly indicate the relevance of cultivar selection and optimisation of germination conditions before planning strategies of designing a functional food for improving consumer's health. Previous studies have focused on optimisation of the germination process to maximise the nutritional quality of GBR (Rusydi, Noraliza, Azrina, & Zulkhairi, 2011). So far, little has been reported about the optimisation of soaking and germination conditions to produce GBR with improved phytochemical content and antioxidant activity. Thus, we have focused this work on the optimisation

of the phytochemical load (GABA and phenolic compounds) and antioxidant activity of sprouts from different commercial Ecuadorian BR cultivars.

The objectives of the present study were to evaluate the effect of germination time and temperature of BR on potential health-promoting phytochemicals (GABA and TPC), to evaluate the antioxidant activity to assess suitable rice cultivars and to optimise germination time and temperature in relation to concentrations of these bioactives and antioxidant activity in BR sprouts. Moreover, this study shows model equations that predict the phytochemical composition and antioxidant activity of BR sprouts based on germination time and temperature.

2. Material and methods

2.1. Plant materials

Commercial certified BR cultivars INIAP 14, INIAP 15 and INIAP 17 (coded cv. 14, cv. 15 and cv. 17) and experimental cultivar GO39839 (coded cv. GO) were provided by the National Autonomous Institute of Agricultural Research, Ecuador (Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP). All varieties had similar harvest yields and seed appearance was translucent, white centre with extra-long grains.

2.2. Chemicals and reagents

Liquid chromatography (LC)-grade acetonitrile and methanol were purchased from Lab-Scan (Gliwice, Poland). Analytical grade methanol was provided by Scharlau (Barcelona, Spain). Other chemical reagents and standards used were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore Billerica, MA, USA).

2.3. Seed germination

BR seeds of each cultivar (50 g) were rinsed in distilled water and surface sterilised by 0.1% sodium hypochlorite (seed:NaOCl ratio, 1:5 w/v) for 30 min and drained. Afterwards, hygienised grains were rinsed with sterile distilled water to neutral pH. Seeds were then placed in deionised water (seed:water ratio, 1:5 w/v) and soaked at 28 °C for 24 h. Soaking water was drained and the seeds were placed on a drilled grille over moist filter. Seed were covered by moist filter paper and the grille was placed in plastic germination trays containing distilled water. Germination trays containing hydrated rice seeds were introduced in a germination cabinet (model EC00-065, Snijders Scientific, Netherlands) provided with a water circulating system to keep 90% air humidity. Germination was carried out at 28 and 34 °C in darkness for 48 and 96 h. Germination percentage was calculated as an estimation of seed viability and the germinated percentage was calculated from the following equation: GP = (GBR seeds/total BR seeds) \times 100. GBR seeds were those with the radical projected from the embryo. Finally, GBR samples were freeze-dried (Virtis Company, INC. Gardiner, NY, USA), and homogenised by using a ball mill (Glen Creston Ltd., Stanmore, UK). Powdered samples were stored in plastic bags, under vacuum, in darkness at 4 °C until further analysis. Each cultivar had three replications for each germination condition.

2.4. Determination of γ -aminobutyric acid

The content of γ -aminobutyric acid (GABA) was determined using reversed-phase high performance liquid chromatography as described previously (Torino et al., 2013). Briefly, 0.5 g of sample was suspended in 12 ml distilled water. The suspension was stirred

at 4 °C for 16 h. Two independent extractions were performed for each replicate. Samples were centrifuged at 15,000 rpm at 10 °C for 20 min. The supernatant was vacuum-dried and dissolved in 500 µl of distilled water. A volume of 50 µl of extract was added to 10 µl of an internal standard solution containing 1.2 mg/ml allyl-L-glycine and 20 µl of 20% (v/v) triethylamine in 50% methanol (v/v). Mixtures were derivatised by adding 30 µl of phenyl isothiocyanate. Subsequently, samples were vacuum-dried, reconstituted in 500 µl of 0.1 M ammonium acetate pH 6.5 (mobile phase A) and centrifuged at 13,000 rpm at 10 °C for 5 min. Supernatants were filtered through a 0.22 µm nylon filter (Millipore Iberica, Madrid, Spain).

HPLC analyses were performed with an Alliance Separation Module 2695 (Waters, Milford, USA), equipped with a photodiode array detector 2996 (Waters). Samples (20 µl) were injected onto a C₁₈ Alltima (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) column (Grace & Co., Albany, OR, USA) equipped with a guard column (Grace & Co.), both thermostated at 40 °C. The chromatograms were developed at a flow rate of 0.7 ml/min by eluting the sample in mobile phase A (0.1 M ammonium acetate pH 6.5) and mobile phase B (0.1 M ammonium acetate, acetonitrile, methanol, 44/46/10, v/v/v, pH 6.5) as follows: isocratic flow 100% A for 15 min, gradient flow from 100% A to 100% B for 27 min, isocratic flow 100% B for 8 min and finally equilibrated with 100% A for 5 min. Data acquisition and integration was performed using Empower II software (Waters). GABA was identified by retention time and spiking the sample with a standard solution. GABA content was quantified by using an external GABA standard calibration curve with a linear range over 0–240 µg/ml. Analyses were carried out in duplicate. The results were expressed in mg GABA/100 g of sample on dry matter basis (d.m.).

2.5. Determination of total phenolic compounds

The content of total phenolic compounds (TPC) was analysed using Folin–Ciocalteu's phenol reagent as described previously (Torino et al., 2013). Briefly, 0.5 g of sample were extracted in 10 ml of 80% (v/v) methanol–HCl (1000/1) in distilled water by continuous magnetic stirring at room temperature for 16 h. Two independent extractions were performed for each replicate. Extracts were centrifuged at 5000 rpm at 5 °C for 5 min. An aliquot of 100 µl of diluted extract was mixed with 625 µl distilled water, 250 µl 7.5% (w/v) sodium carbonate and 25 µl of 2 N Folin–Ciocalteu's phenol reagent. Reaction mixtures were vortexed and incubated in darkness at room temperature for 2 h. The absorbance was measured at 739 nm in triplicate using a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) controlled by the Gene 5™ software version 1.1. (BioTek Instruments). A gallic acid standard curve with a linear range (0–225 µg gallic acid/ml) was prepared from a freshly made 1 mg/ml gallic acid stock solution. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) in 100 g of dry matter (d.m.).

2.6. Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity was analysed in the methanolic extracts previously obtained for TPC determination. Antioxidant activity was evaluated by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) method previously described (Torino et al., 2013), with some modifications. The reaction was carried out at 37 °C in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 150 min. Reaction mixtures contained 180 µl of 70 nM fluorescein, 90 µl of 12 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) and 30 µl of diluted sample or the standard Trolox at concentrations ranging from 1 to 8 µM. Reaction mixtures were placed in a black 96 well plate (Fisher Scientific) in triplicate. The plate was automatically

shaken and the fluorescence was read in a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments) every minute at λ_{exc} 485 nm and λ_{emi} 520 nm. The equipment was controlled by Gene5™ software, version 1.1. (BioTek Instruments). The areas under the fluorescence decay curve (AUC) based on relative fluorescence values to the initial reading were recorded and the AUC of blanks subtracted. Analyses were carried out in duplicate. Results were expressed as mg of Trolox equivalents (TE) in 100 g d.m.

2.7. Statistical analysis

Data shown are mean values of two determinations for each germination condition ± standard deviation. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD). Differences between cultivars and germination conditions were compared by using a Duncan's multiple-range test at $P \leq 0.05$ probability levels.

To find out the optimum germination time and temperature for high antioxidant activity, GABA and TPC content in GBR, the response surface approach was applied (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escalera, 2008). The response value Y was estimated by the following equation:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

where Y is the response variable; x_1 and x_2 are the independent variables representing germination time and temperature, respectively; b_0 is a constant coefficient; b_1 and b_2 are the linear coefficients; and b_{12} , b_{11} and b_{22} are the factor interaction coefficients. The model was simplified by removing insignificant terms according to the backward elimination technique (Mendenhall & Sincich, 1996).

3. Results

3.1. Germination percentage

The present study shows that Ecuadorian BR cultivars GO, 14, 15 and 17 germinated effectively under the experimental conditions assayed. Soaking at 28 °C for 24 h and germination either at 28 and 34 °C for Ecuadorian BR cultivars resulted in germination percentages of 92–94% after 2 days and 96–98% after 4 days (Fig. 1). Moreover, no significant differences were observed in germination percentages among the Ecuadorian BR cultivars studied ($P \geq 0.05$).

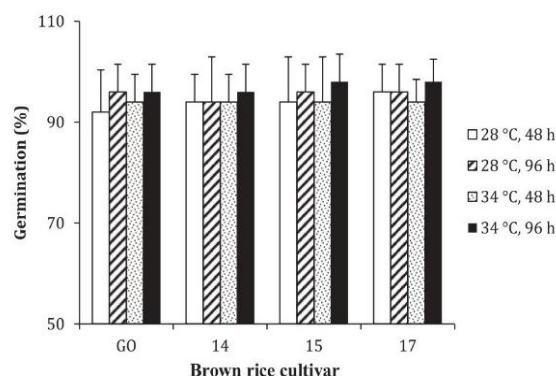


Fig. 1. Germination percentage of Ecuadorian BR cultivars at different temperatures (28 and 34 °C) and time (48 and 96 h). Values are the mean of three replicates. Bars indicate the standard deviation.

3.2. Effect of germination time and temperature on GABA content, TPC and antioxidant activity of sprouts from Ecuadorian BR cultivars

Fig. 2 shows the response surface plots of BR germination depending on the effects of temperature and time on GABA, TPC and antioxidant activity. The RSM was used to study the influence of two independent variables, temperature and time (24–120 h) in the germination process. Steeping time (24 h) was included in RSM plots as part of the germination process. Three response variables were evaluated: GABA content, TPC content and antioxidant activity. Response values for each set of variable combinations from GBR samples is presented in Tables 1–3. ANOVA was used to assess the main terms affecting responses; among them, time had a significant effect ($P \leq 0.05$) on all responses. Germination temperature had also a significant effect on GABA, TPC and antioxidant activity ($P \leq 0.05$), with the exception of GABA for cv. GO and 14, and TPC for cv. GO. The predictive empirical models for GABA and TPC formation and the antioxidant activity for sprouts of Ecuadorian BR cultivars is presented in Table 4. The results of the experiments are detailed below.

3.2.1. Effect of germination time and temperature on GABA content

Table 1 shows the GABA content of ungerminated, soaked and GBR from four Ecuadorian cultivars. GABA content in ungerminated BR was significantly different ($P \leq 0.05$) among cultivars ranging from 4.3 to 8.3 mg GABA/100 g d.m. Raw BR cv. GO had the highest GABA compared with cultivars 14, 15 and 17 ($P \leq 0.05$). Soaking process increased GABA levels from 1.3-fold in cv. GO to 3-fold in cv. 17.

GABA was accumulated in GBR throughout the germination time in all cultivars (Table 1, Fig. 2). Maximum GABA concentrations were found in 96 h-GBR in all cultivars ($P \leq 0.05$). GABA content of GBR was differently affected by germination temperature in studied cultivars. Additionally, temperature and time interacted significantly on GABA accumulation in cv. 15 and 17 ($P \leq 0.05$) (Table 4). Interestingly, germination at 28 °C afforded a higher GABA accumulation in 48 h-GBR from cv. 15 and 17 ($P \leq 0.05$) compared with germination for 48 h at 34 °C (Table 1). GABA content in cv. GO and 14 germinated for 48 h was not significantly affected ($P \geq 0.05$) by temperature (Table 1, Fig. 2). Germination at 34 °C led to higher GABA concentrations in 96 h-GBR cv. GO, 15 and 17 ($P \leq 0.05$) compared with germination at 28 °C for the same germination time (Table 1). However, temperature did not have a significant impact ($P \leq 0.05$) on the GABA content of 96 h-GBR from cv. 14. Finally, it is relevant to stress that GBR cv. 15 obtained at 34 °C for 96 h showed the highest GABA content (139.3 mg/100 g d.m) (Table 1).

The response surface model showed that the optimum assayed conditions for GABA accumulation were obtained at the largest time (120 h) at 28 °C for cv. GO and 14, and at 34 °C for cv. 15 and 17. The optimum predicted GABA concentration at these conditions was 115.7, 125.7, 135.5 and 122.3 mg/100 g d.m for cv. GO, 14, 15 and 17, respectively, which were not significantly different from those observed experimentally.

3.2.2. Effect of germination time and temperature on TPC

Table 2 shows the TPC contents of ungerminated, soaked and GBR from the four Ecuadorian cultivars studied. TPC in

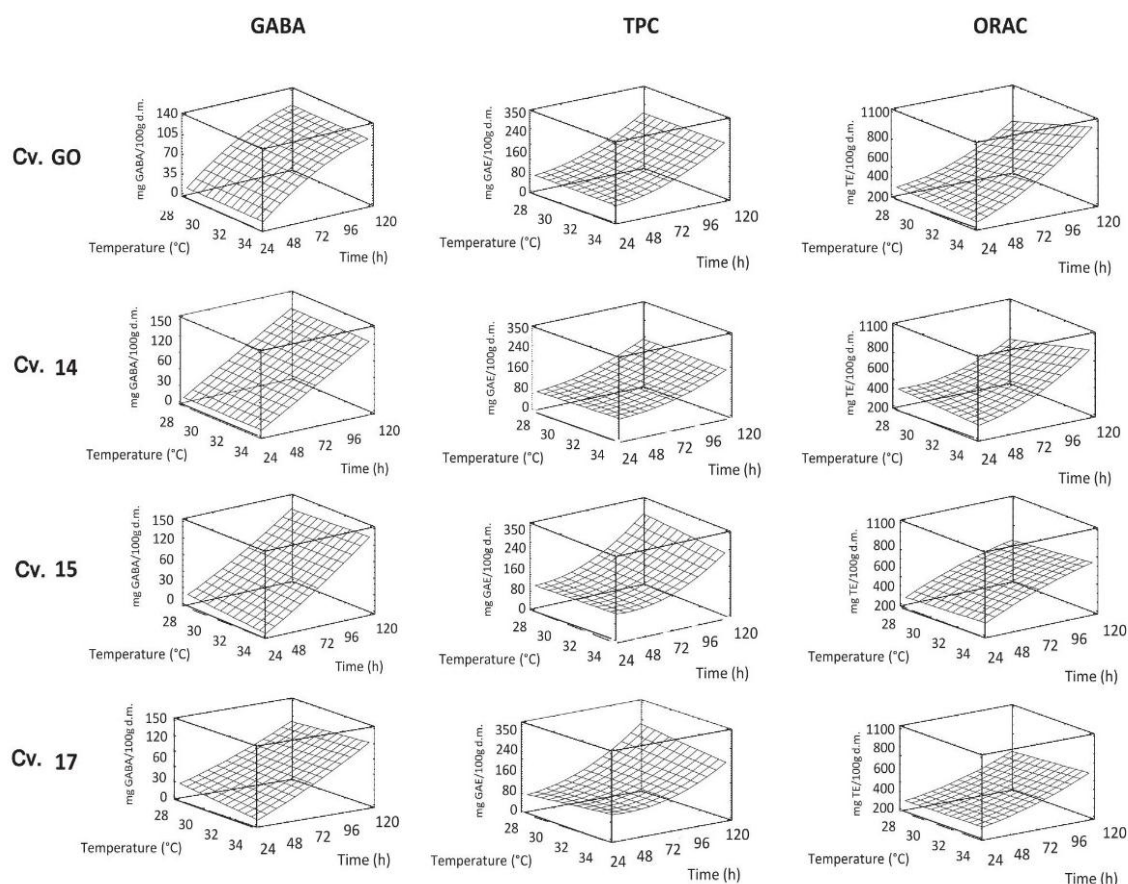


Fig. 2. Response surface plots of germination of Ecuadorian BR cultivars (GO, 14, 15 and 17) showing the effects of temperature and time on GABA content, TPC and antioxidant activity.

Table 1

GABA content (mg/100 g d.m.) in ungerminated, soaked and germinated grains of four Ecuadorian brown rice cultivars (GO, 14, 15, 16 and 17).

Treatment	Temperature (°C)	Time (h)	GO	14	15	17
Ungerminated grain	–	–	8.26 ± 0.67 ^a _C	4.34 ± 0.18 ^a _A	4.69 ± 0.35 ^a _{AB}	5.07 ± 0.41 ^a _B
Soaking	28	24	10.70 ± 1.05 ^b _C	7.97 ± 0.45 ^b _A	9.18 ± 0.69 ^b _B	16.69 ± 0.69 ^b _D
Germination	28	48	80.70 ± 1.28 ^c _{BC}	70.81 ± 4.04 ^c _A	83.14 ± 0.79 ^d _C	77.66 ± 2.26 ^d _B
	28	96	107.48 ± 2.04 ^d _A	122.78 ± 5.23 ^d _B	124.43 ± 6.02 ^e _B	102.26 ± 5.12 ^e _C
	34	48	76.66 ± 3.66 ^c _D	62.56 ± 2.60 ^c _C	54.22 ± 3.05 ^c _B	44.63 ± 1.33 ^c _A
	34	96	123.92 ± 5.94 ^e _A	127.98 ± 10.07 ^d _A	139.32 ± 5.75 ^f _B	129.47 ± 6.08 ^f _{AB}

Data are the mean values ± standard deviation of three independent experiments ($n = 3$). Different lowercase letters indicate significant difference among mean values within a column ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test). Different capital letters indicate significant difference among mean values within a row ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test).

Table 2

Total phenolic content (mg GAE/100 g d.m.) in ungerminated, soaked and germinated grains of four Ecuadorian brown rice cultivars (GO, 14, 15, 16 and 17).

Treatment	Temperature (°C)	Time (h)	GO	14	15	17
Ungerminated grain	–	–	57.65 ± 2.49 ^a _A	77.84 ± 5.37 ^a _B	76.85 ± 3.78 ^a _B	73.52 ± 3.13 ^a _B
Soaking	28	24	66.61 ± 4.01 ^b _A	81.63 ± 2.71 ^b _B	99.73 ± 3.55 ^b _C	81.73 ± 2.54 ^b _B
Germination	28	48	114.04 ± 5.08 ^c _B	108.96 ± 6.39 ^c _{AB}	129.57 ± 4.99 ^c _C	103.64 ± 7.18 ^c _A
	28	96	252.16 ± 4.42 ^d _B	207.61 ± 7.90 ^d _A	306.65 ± 9.98 ^d _D	286.73 ± 7.57 ^d _C
	34	48	133.38 ± 2.53 ^d _B	127.86 ± 6.28 ^d _A	150.10 ± 4.04 ^d _C	150.10 ± 2.59 ^d _C
	34	96	241.40 ± 3.25 ^e _C	193.68 ± 8.08 ^e _A	259.72 ± 9.19 ^e _D	213.02 ± 5.60 ^e _B

Data are the mean values ± standard deviation of three independent experiments ($n = 3$). Different lowercase letters indicate significant difference among mean values within a column ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test). Different capital letters indicate significant difference among mean values within a row ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test).

Table 3

Antioxidant activity (mg TE/100 g d.m.) in ungerminated, soaked and germinated grains of four Ecuadorian brown rice cultivars (GO, 14, 15, 16 and 17).

Treatment	Temperature (°C)	Time (h)	GO	14	15	17
Ungerminated grain	–	–	242.67 ± 19.19 ^a _A	311.35 ± 13.42 ^a _C	291.71 ± 11.58 ^a _B	316.83 ± 13.29 ^a _C
Soaking	28	24	262.05 ± 17.94 ^b _A	361.50 ± 9.10 ^b _C	296.24 ± 12.72 ^a _B	298.93 ± 13.65 ^a _B
Germination	28	48	467.08 ± 18.11 ^b _B	467.00 ± 13.07 ^b _B	456.95 ± 12.37 ^b _B	404.51 ± 11.04 ^b _A
	28	96	729.60 ± 20.87 ^c _C	674.21 ± 26.05 ^d _B	678.09 ± 18.35 ^d _B	626.06 ± 26.57 ^d _A
	34	48	517.04 ± 29.95 ^c _B	479.60 ± 23.15 ^c _A	612.25 ± 24.33 ^c _C	467.88 ± 18.04 ^c _A
	34	96	1054.68 ± 49.54 ^e _C	965.12 ± 20.45 ^e _B	718.21 ± 29.80 ^e _A	681.35 ± 31.91 ^e _C

Data are the mean values ± standard deviation of three independent experiments ($n = 3$). Different lowercase letters indicate significant difference among mean values within a column ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test). Different capital letters indicate significant difference among mean values within a row ($P \leq 0.05$ according to Duncan's test).

Table 4

Predictive multiple linear regression based on the RSM of GABA, TPC and antioxidant activity as measured by ORAC for four germinated Ecuadorian brown rice cultivars (GO, 14, 15 and 17).

Cultivar	Response	Model	Predicted model	R ²
GO	GABA (mg/100 g d.m.)	Quadratic without interaction	$Y(T,t) = -34.2647 + 2.02966 \times t - 0.00649975 \times t^2$	0.983
	TPC (mg GAE/100 g d.m.)	Quadratic without interaction	$Y(T,t) = 63.9014 - 0.239681 \times t + 0.0146973 \times t^2$	0.992
	ORAC (mg TE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = 794.882 - 18.7425 \times T - 15.7889 \times t + 0.544697 \times T \times t + 0.0379633 \times t^2$	0.981
14	GABA (mg/100 g d.m.)	Pure linear	$Y(T,t) = -21.5128 + 1.22664 \times t$	0.990
	TPC (mg GAE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = 15.0221 + 2.23525 \times T + 0.429252 \times t - 0.026276 \times T \times t + 0.0113867 \times t^2$	0.974
	ORAC (mg TE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = 1016.9 - 20.7811 \times T - 17.0041 \times t + 0.500486 \times T \times t + 0.0426264 \times t^2$	0.960
15	GABA (mg/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = 89.3497 - 3.3682 \times T - 0.150929 \times t + 0.0356642 \times T \times t + 0.0023137 \times t^2$	0.968
	TPC (mg GAE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = -15.1759 + 4.29992 \times T + 1.14789 \times t - 0.0789785 \times T \times t + 0.0222498 \times t^2$	0.977
	ORAC (mg TE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = -71.7061 + 7.09389 \times T + 4.64064 \times t + 0.0622064 \times T \times t - 0.0167007 \times t^2$	0.952
17	GABA (mg/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = 135.858 - 4.42264 \times T - 0.905722 \times t + 0.051392 \times T \times t + 0.0024870 \times t^2$	0.923
	TPC (mg GAE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = -168.016 + 8.43192 \times T + 3.15678 \times t - 0.131625 \times T \times t + 0.0182717 \times t^2$	0.948
	ORAC (mg TE/100 g d.m.)	Quadratic with interaction	$Y(T,t) = 257.971 + 0.214647 \times T - 1.89938 \times t + 0.0928168 \times T \times t + 0.0188063 \times t^2$	0.980

T = temperature; t = time.

ungerminated BR was significantly ($P \leq 0.05$) higher in cultivars 14, 15 and 17 (74–78 mg GAE/100 g d.m.) than in cultivar GO (58 mg GAE/100 g d.m.). The soaking process slightly increased TPC in all BR cultivars ($P \leq 0.05$).

Germination brought about a noticeable increase in TPC ($P \leq 0.05$), and this effect was time-dependent in all the cultivars

studied (Table 2, Fig. 2). In this sense, TPC increased up to 2 and 4-fold in BR germinated for 48 and 96 h, respectively. Moreover, germination temperature significantly influenced TPC accumulation in all GBR cultivars ($P \leq 0.05$) (Table 2, Fig. 2). Moreover, temperature and time interacted significantly on TPC accumulation in cv. 14, 15 and 17 ($P \leq 0.05$) (Table 4). BR germinated for

48 h showed a higher TPC content at 34 °C (127.8–150.1 mg GAE/100 g d.m.) than at 28 °C (108–129 mg GAE/100 g d.m.) ($P \leq 0.05$). Inversely, 96 h-GBR exhibited higher TPC content at 28 °C (207.6–306.6 mg GAE/100 g d.m.) than at 34 °C (193.7–259.7 mg GAE/100 g d.m.) ($P \leq 0.05$). Finally, it is worth emphasising that the highest TPC content was observed for GBR cv. 15 obtained at 28 °C for 96 h (306.6 mg GAE/100 g d.m.).

The response surface model showed that the optimum evaluated conditions for TPC accumulation during germination were at temperatures of approximately 28 °C and the largest processing time (120 h). The optimum predicted TPC concentration at these conditions was 246.8, 204.8, 298.0, 267.7 mg GAE/100 g d.m. for cv. GO, 14, 15 and 17, respectively, which were quite similar to those experimentally obtained.

3.2.3. Effect of germination time and temperature on antioxidant activity

Antioxidant activity of ungerminated, soaked and GBR from the four studied Ecuadorian cultivars is presented in Table 3. Among the BR cultivars, antioxidant activity differed greatly and the highest levels corresponded to cv. 14 and 17 (311.4 and 316.8 mg TE/100 g d.m., respectively), followed by cv. 15 (291.7 mg TE/100 g d.m.) and cv. GO (242.7 mg TE/100 g d.m.) ($P \leq 0.05$). Antioxidant activity of soaked BR was not statistically different from raw BR, with the exception of cv. 14, in which a slight although significant increase was observed ($P \leq 0.05$).

Germination time directly affected the antioxidant activity of BR sprouts (Table 3, Fig. 2). Antioxidant activity of GBR increased prominently with longer germination time ($P \leq 0.05$). ORAC values were up to 2-fold and 4-fold higher after sprouting for BR germinated at 48 and 96 h, respectively (Table 3). Among cultivars, antioxidant activity also varied greatly following sprouting at different germination temperatures (Table 3, Fig. 2). In addition, temperature and time interacted significantly on antioxidant activity in all BR cultivars ($P \leq 0.05$) (Table 4). Thus, both 48 h and 96 h-GBR samples presented higher antioxidant capacity at 34 °C than at 28 °C ($P \leq 0.05$) (Table 3). Among all of the sprouted BR tested, 96 h-GBR produced at 34 °C showed the highest antioxidant activity (1054.7 mg TE/100 g d.m.) (Table 3).

The response surface model showed that the best studied germination conditions to maximise antioxidant activity in rice sprouts were temperatures of approximately 34 °C and the longest time (120 h). The optimum predicted antioxidant activity at these conditions was 1032.0, 925.6, 739.7, 686.8 mg TE/100 g d.m. for cv. GO, 14, 15 and 17, respectively, which did not differ significantly from those experimentally observed.

4. Discussion

White rice is the staple food for most people in the low- and middle-income regions of the world. In these regions, a growing incidence and prevalence of chronic diseases such as type-2 diabetes have been linked to white rice consumption (Hu, Palik, & Sun, 2012). Prolonged consumption of white rice may lead to other disorders, such as obesity, glucose intolerance and cardiovascular disease due to its high glycemic index. Recently, consumption of BR has gained popularity among health conscious consumers due to its lower glycemic index (Palasangui & Thompson, 2006). To our knowledge, the present work is the first report on characterisation of the phytochemical content (GABA and TPC) and antioxidant potential of Ecuadorian BR cultivars. Interestingly, total phenolic content of Ecuadorian BR cultivars studied here was higher than recently reported data for Asian non-pigmented BR varieties (Huang & Ng, 2012), which suggests their potential as promising cultivars for development of healthy foods.

Nevertheless, an existing limitation for the consumption of BR is its lower organoleptic quality (poor texture, off putting bran odour), low digestibility and difficulty to cook. Germination is a strategy to improve the organoleptic quality of BR and, besides, it provides additional increases in the content of bioactive compounds (Donkor, Stojanowska, Ginn, Ashton, & Vasiljevic, 2012). Therefore, GBR might be a quick and cost-effective alternative to reduce the risk of chronic disease in the developing world without altering the existing consumption habits.

Germination of rough rice (whole kernel and grain) seems to be more effective than germination of BR (Moongngarm & Saetung, 2010), however rough rice sprouts are abrasive and hardly edible. Therefore, germination of BR is preferable and de-husking should be carried out in a way that will not cause detrimental effects on germination yield. It is worth noting that GBR could be produced not only by the industrial sector, but also in the household by soaking BR grains in water and further sprouting, which is a more affordable alternative for low and middle income regions.

Temperature is a key point to germinate BR grains. Most of the scientific studies on germinated rice have been carried out at temperatures of the producers' countries (between 28 and 34 °C). However, a systematic study comparing germination percentages at such temperatures in different BR varieties had not been carried out so far. In this sense, the present study shows that Ecuadorian BR cultivars GO, 14, 15 and 17 germinated effectively under the experimental conditions assayed (germination percentage >90%). These results are higher than those found in the literature for BR cultivar RD-6 (84.3%) (Moongngarm & Saetung, 2010). Differences in these percentages could be explained as the germination rate seems to be influenced by several factors, such as the amount of water added and soaking time. In addition, temperature has a profound effect on germination by affecting the metabolic reactivation and postgermination growth of the sprout. Yoshida (1981) showed that to reach 90% germination, longer times of incubation are needed at 15 °C compared with incubation at temperatures ranging from 25 to 40 °C, however no further studies have been conducted so far.

The phytochemical quality of sprouts depends on many factors such as genotype, steeping and germination conditions. This means that optimum conditions need to be defined for individual cereal cultivars to improve the functional quality of the sprout. Therefore, our primary goal was to establish those germination conditions affording the highest concentration of GABA, TPC and antioxidant activity in four Ecuadorian BR cultivars by the RSM.

The results of the present study showed that GABA accumulation was initiated in the soaking process and continued in a time-dependent manner during germination in all the cultivars. These results are in accordance with previous studies (Sen, Tewu, Lijun, & Shanbai, 2008). This can be explained by the fact that the soaking process induces glutamate decarboxylase (GAD) activity which increases with germination time. GAD catalyses the γ -decarboxylation of L-glutamic acid to carbon dioxide and GABA. In addition, it has been reported recently that GABA could be formed from putrescine during the response to abiotic stress (Shelp et al., 2012). Moreover, cultivar differences in GABA accumulation have been reported during water soaking of ten rice varieties (Saikusa, Horino, & Mori, 1994). Our results also show for the first time that germination temperature affected the GABA accumulation rate differently depending on the cultivar. GABA accumulation was slowed down at 34 °C compared to 28 °C in cv. 15 and 17 whereas this effect was not found for cv. GO and 14. The highest GABA concentrations in sprouts were observed at higher temperatures (34 °C), which is in consistency with studies showing that GAD activity in rice increase with increasing temperatures from 20 to 40 °C (Yang, Yin, Guo, & Gu, 2013). Interestingly, the GABA content of Ecuadorian varieties of 96 h-GBR was higher than that

found in the literature for 181 Asian varieties ranging from 34.6 to 87.8 mg GABA/100 g d.m. (Sen et al., 2008). It is accepted that a daily intake of 20 mg of GABA is able to prevent moderate hypertension in adults (Tsuchida et al., 2003). Therefore, ~25 g of GBR (d.m) obtained in this study would provide enough GABA to contribute to this effect. Nevertheless, future animal experiments should be performed to confirm that consumption of GBR has an antihypertensive effect.

BR seems to be a good source of phenolic compounds and our results are within the range of previously reported data for non-pigmented BR varieties. The predominant phenols were *p*-coumaric and ferulic acids, however, the phenolic composition of BR may vary among genotypes (Huang & Ng, 2012). Similarly to GABA, TPC content increased dramatically as a consequence of soaking and germination regardless of cultivar, results which are in agreement with information provided by other authors (Moongngarm & Saetung, 2010). The increase in phenolic compounds found in BR may be explained by the fact that germination induces enzyme expression/activation of the phenylpropanoid pathway and hydrolysis of cell wall polysaccharides that cause the release of cell wall-bound phenolics (He, Han, Yao, Shen, & Yang, 2011). This is supported by Tian, Nakamura, and Kayahara (2004) that showed an increase in free phenolic acids (ferulic, *p*-coumaric and sinapic acids) and hydrolysable phenolic compounds, as well as decreases in the hydroxycinnamate sucrose esters in GBR. In the present work, the highest amounts of TPC were observed at a germination temperature of 28 °C for 96 h. Lower TPC was observed in GBR at 34 °C in all cultivars. These results could be due to increases in the activity of enzymes responsible for the oxidation of endogenous phenolic compounds and phenolic-containing biomolecules, such polyphenol oxidases (PPO) and peroxidases (POX). This hypothesis is supported by studies in which PPO activity was increased with higher temperatures during sprouting of wheat (Gupta et al., 2013). Moreover, optimum germination conditions (28 °C, 96 h) gave rise to greater TPC content than those reported in previous studies (Moongngarm & Saetung, 2010). Additionally, we observed that the TPC content was affected by germination temperature differently depending on cultivar, results that have not been reported so far.

With regards to antioxidant activity, it is worth noting that germination brought about an enhancement of the antioxidant potential of BR, in agreement with previous studies (Tian et al., 2004). Antioxidant activity of BR during germination was time and temperature dependent. This effect could be attributed to higher accumulation of compounds with peroxy-scavenging activity, such as phenolic compounds (Andriantsitohaina et al., 2012). TPC content was positively correlated with antioxidant activity in all cultivars studied ($P \leq 0.05$) which supports this hypothesis. Contrary to this observation, some reports have demonstrated that GBR display higher antioxidant capacity as hydrolytic enzymes may release free phenolics with more effective antioxidant activities (Tian et al., 2004). Moreover, it has been reported that germination under high temperature (42 °C) induced several radical scavenging enzymes such as superoxide dismutases, glutathione S-transferase, catalase, peroxidases, and enzymes in the ascorbate–glutathione cycle which keep a balance of redox homeostasis (Gupta et al., 2013). The GBR obtained in this study is a valuable source of natural antioxidants that most likely can positively influence the overall antioxidant status in humans. A recent study demonstrated that GBR supplementation increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in hypercholesterolemic rabbits (Esa et al., 2013). Predicted antioxidant activity in GBR obtained under optimum germination conditions (34 °C for 96 h) ranged from 687 to 1032 mg TE/100 g d.m. among cultivars. These results on antioxidant activity provide added value to GBR to enrich bakery products, as it has been recently incorporated to wheat flour for the

production of chapatti bread with enhanced antioxidant activity (Gujral, Sharma, Bajaj, & Solah, 2012).

5. Conclusion

Germination led to improvements in the GABA and TPC concentrations and antioxidant activity of BR. Optimal germination conditions for accumulation of GABA and antioxidant activity were obtained after soaking at 28 °C for 24 h, followed by germination at 34 °C for 96 h, while the highest TPC was found in GBR obtained at 28 °C for 96 h. BR cv. GO more effectively accumulated antioxidants with peroxy-scavenging activity (predicted value 1032 mg TE/100 g d.m.), while cv. 15 was more effective at accumulating GABA (predicted value 135.5 mg/100 g d.m.) and TPC (298 mg GAE/100 g d.m.) under the optimal germination conditions. These germinated grains with improved levels of bioactive compounds can be consumed as direct foods or incorporated to staple foods, and to be offered as preventative food strategies in combating chronic diseases.

Acknowledgements

This work was financially supported by AGL2010-16310 Project from the Ministry of Science and Innovation (MICINN, Spain). P. J. Cáceres is indebted to the Ministry of High Education, Science, Technology and Innovation (SENESCYT, Ecuador) for the foreign Ph.D. grant. We also acknowledge to National Autonomous Institute of Agricultural Research from Ecuador (INIAP) for providing the BR cultivars.

References

- Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Etienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M. C., et al. (2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 108, 1532–1549.
- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317S–325S.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965–977.
- Donkor, O. N., Stojanowska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains-sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135, 950–959.
- Esa, N. M., Abdul-Kadir, K.-K., Amon, Z., & Azlan, A. (2013). Antioxidant activity of white rice, brown rice and germinated brown rice (*in vivo* and *in vitro*) and the effects on lipid peroxidation and liver enzymes in hyperlipidaemic rabbits. *Food Chemistry*, 141, 1306–1312.
- FAOSTAT. Food and Agricultural Organization from the United Nations. (2013). (<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>). Accessed 22.08.2013.
- Goffman, F., & Bergman, C. J. (2004). Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1235–1240.
- Gujral, H. S., Sharma, P., Bajaj, R., & Solah, V. (2012). Effect of incorporating germinated brown rice on the antioxidant properties of wheat flour chapatti. *Food Science and Technology International*, 18, 47–54.
- Gupta, N. K., Agarwal, S., Agarwal, V. P., Nathawat, N. S., Gupta, S., & Singh, G. (2013). Effect of short-term heat stress on growth, physiology and antioxidative defence system in wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1837–1842.
- He, D., Han, C., Yao, J., Shen, S., & Yang, P. (2011). Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics*, 11, 2693–2713.
- Hu, E. A., Palik, P. V., & Sun, Q. (2012). White rice consumption and risk of type 2 diabetes: Meta-analysis and systematic review. *British Medical Journal*, 344(e1454), 1–9.
- Huang, S.-H., & Ng, L.-T. (2012). Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 122–127.
- Imam, M. U., Azmi, N. H., Bhanger, M. I., Ismail, N., & Ismail, M. (2012). Antidiabetic properties of germinated brown rice. A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–12 [Article ID 816501].
- Ito, S. (2004). Marketing of value-added rice products in Japan: Germinated brown rice and rice bread. *Food Agricultural Organization FAO rice conference*, Rome Italy, <<http://www.fao.org/rice2004/en/pdf/ito.pdf>>. Accessed 22.08.2013.
- Kim, S. P., Kang, M. Y., Nam, S. H., & Friedman, M. (2012). Dietary rice component γ -oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 935–944.

- Kim, H.-Y., Hwang, I. G., Kim, T. M., Woo, K. S., Park, D. S., Kim, J. H., et al. (2012). Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. *Food Chemistry*, 134, 288–293.
- Mendenhall, W., & Sincich, T. (1996). *A second course in Statistics: Regresion analysis*. New Jersey: Prentice Hall Inc. [pp. 899].
- Monks, J. L. F., Levien-Vanier, N., Casaril, J., Manica-Berto, R., de Oliveira, M., Baptista-Gomes, C., Peres de Carvalho, M., Guerra-Dias, A. R., & Cardoso-Elias, M. (2013). Effects of milling on proximate composition, folic acid, fatty acids and technological properties of rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30, 73–79.
- Moongarm, A., & Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122, 782–788.
- Oh, C. H., & Oh, S. H. (2004). Effects of germinated brown rice extract with enhanced levels of GABA of cancer cell proliferation and apoptosis. *Journal of Medical Food*, 7, 19–23.
- Oh, S. H., & Oh, C. H. (2003). Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Science and Biotechnology*, 12, 248–252.
- Palasangui, L. N., & Thompson, I. U. (2006). Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 151–158.
- Rusydi, M., Noraliza, C. W., Azrina, A., & Zulkhairi, A. (2011). Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *International Food Research Journal*, 18, 705–713.
- Saikusa, T., Horino, T., & Mori, Y. (1994). Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 2291–2292.
- Sen, Y., Tewu, Y., Lijun, Z. H., & Shanbai, X. (2008). The variation of γ -aminobutyric acid content in germinated brown rice among different cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 41, 3974–3982.
- Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Trobacher, C. P., Zarei, A., Deyman, K. L., & Brikis, C. J. (2012). Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science*, 193–194, 130–135.
- Tian, S., Nakamura, K., & Kayahara, H. (2004). Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4808–4813.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., et al. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030–1037.
- Tsuchida, T., Mashiko, K., Yamada, K., Hiratsuka, H., Shimada, T., Itagaki, Y., et al. (2003). Clinical study of γ -aminobutyric acid-rich *Chlorella* for subjects with high-normal blood and mild-hypertension. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 56, 97–102.
- Watcharaparpai boon, W., Laohakunjit, N., & Kerchoechuen, O. (2010). An improved process for high quality and nutrition of brown rice production. *Food Science and Technology International*, 16, 147–158.
- Yang, R., Yin, Y., Guo, Q., & Gu, Z. (2013). Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba* L.). *Food Chemistry*, 138, 1945–1951.
- Yoshida, S. (1981). Growth and development of the rice plant. In S. Yoshida (Ed.), *Fundamentals of rice crop Science* (pp. 1–9). Los Baños, Philippines: The international rice Research Institute.
- Zhang, G., Malik, V. S., Pan, A., Kumar, S., Holmes, M. D., Spiegelman, D., et al. (2010). Substituting brown rice for white rice to lower diabetes risk: A focus-group study in Chinese adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 110, 1216–1221.

Patente: Procedimiento de obtención de granos de arroz integral germinado y productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos.

Juana Frias, Cristina Martínez-Villaluenga, Patricio J. Cáceres, Elena Peñas, Lourdes Amigo. Número de solicitud: P201430115. 30 Enero 2014.

Resumen

La presente invención se refiere a un procedimiento sencillo y económico de germinación que, utilizando luz, permite obtener granos de arroz integral germinado y/o productos derivados de los mismos con altos contenidos de compuestos biológicamente activos, preferentemente γ -orizanol y GABA. Los granos de arroz integral germinado obtenidos o los productos derivados de los mismos se utilizan en la elaboración de composiciones alimentarias o cosméticas, que adicionalmente a su valor nutricional, comprenden un alto contenido en compuestos bioactivos saludables, que los hacen recomendables tanto para una alimentación completa, como para la prevención y/o disminución del riesgo de aparición de patologías crónicas degenerativas.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201430115	
Fecha de recepción:	30 enero 2014, 13:57 (CET)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.899	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GRANOS DE ARROZ INTEGRAL GERMINADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS MISMOS QUE COMPRENDEN COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (11 p.) Reivindicaciones-1.pdf (2 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	30 enero 2014, 13:58 (CET)	
Codificación del envío:	DD:D9:97:C0:5B:57:B5:5C:8B:91:B0:0D:7A:FA:8E:71:0D:42:40:96	

/Madrid, Oficina Receptora/



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	[3] [1]
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACIÓN ADICIÓN A LA PATENTE EUROPEA ADICIÓN A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	[3] [1] [1] [1] [1] [1] [1]
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN: PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [1] España ES Q2818002D C/ Serrano; 117 Madrid 28 Madrid 28006 España ES [3] [1] [1] 100,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	FRIAS AREVALILLO MARIA JUANA España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	MARTINEZ VILLALUENGA CRISTINA España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE:	CACERES COSTALES PATRICIO JAVIER

Resultados

<p>(6-4) INVENTOR 4:</p> <p>NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:</p> <p>APELLIDOS: PEÑAS POZO NOMBRE: ELENA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:</p> <p>(6-5) INVENTOR 5:</p> <p>APELLIDOS: AMIGO GARRIDO NOMBRE: LOURDES NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:</p>	<p>España ES</p> <p>PEÑAS POZO ELENA España ES</p> <p>AMIGO GARRIDO LOURDES España ES</p>
(7) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:	PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GRANOS DE ARROZ INTEGRAL GERMINADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS MISMOS QUE COMPRENDEN COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	<p>SI [] NO [3]</p>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	<p>SI [] NO [3]</p>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	<p>SI [] NO [3]</p>
(11) DEPÓSITO:	<p>REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):</p>
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	<p>LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD [] LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS []</p>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	<p>LUGAR: FECHA:</p>
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	<p>PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:</p>
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:	<p>APELLIDOS: PONS ARIÑO NOMBRE: ANGEL CÓDIGO DE AGENTE: 0499/5 NÚMERO DE PODER: 20081765</p>
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	<p>DESCRIPCIÓN: [3] N.º de páginas: 11 REIVINDICACIONES: [3] N.º de reivindicaciones: 12 DIBUJOS: [3] N.º de dibujos: 2 RESUMEN: [3] N.º de páginas: 1</p>

FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input type="checkbox"/> 3] <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> 3] N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/>]
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA: <div style="text-align: right;"> DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS: </div>	<input type="checkbox"/>] <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(18) NOTAS:	
(19) FIRMA: <div style="text-align: right;"> FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA: </div>	



TASA en materia de Propiedad Industrial
CÓDIGO 511

Modelo
791

Identificación

Ejercicio: 2014

Nro. Justificante: 7915116454883

Sujeto Pasivo:

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: Nº Esc Piso Puerta Tfno.

Municipio: Provincia: Código Postal:

Agente o Representante legal: (1)

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

B84921709 PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL

Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: Nº Esc Piso Puerta Tfno.

Municipio: Provincia: Código Postal:

Código de Agente o Representante: (2) Dígito de control:

0499 5

Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Expediente Modalidad: **P** Número: Tipo: (3)

Clave: **IE01** Año: **2014** Concepto: **Solicitud de Invención por Internet**

Unidades: **1** Importe: **63,05**

Referencia OEPM: **88089478034**



909992100200188089478034

Declarante

Fecha: **30/01/2014**

Firma:

**PONS PATENTES
Y MARCAS
INTERNACIONAL
SL**

Ingreso

Importe en Euros:

Adeudo en cuenta:



Entidad: Oficina: D.C. Nro. Cuenta

2100

NRC Asignado: 7915116454883AA3BF9A50

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
- (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
- (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
- (4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	ES1641.899	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	88089478034	62,43
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	q	
El solicitante es una Universidad pública	q	
Importe total		62,43
Importe abonado		62,43

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GRANOS DE ARROZ INTEGRAL GERMINADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS MISMOS QUE COMPRENDEN COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

5 **DESCRIPCIÓN**

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona con el sector agro-alimentario ya que específicamente se refiere, tanto a un procedimiento de obtención de granos de arroz integral germinado con altos contenidos de compuestos biológicamente activos, como a los granos de arroz integral germinado o a productos derivados de los mismos que se obtienen a partir de dicho procedimiento, como al uso de los mismos para obtener composiciones alimentarias saludables y/o cosméticas, y a las composiciones directamente obtenidas.

15 **ESTADO DE LA TECNICA**

20 La germinación mejora la textura y propiedades organolépticas de los granos integrales de arroz y los nutrientes son más fácilmente digeridos y absorbidos. El interés actual que suscita al arroz integral germinado se debe principalmente al efecto positivo que tiene el proceso de germinación en ciertos compuestos bioactivos que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas, entre los que se encuentran el γ -orizanol y el ácido gamma-aminobutírico (GABA).

25 El γ -orizanol es un potente antioxidante de relevante interés farmacológico, alimenticio y cosmético por sus efectos antioxidantes, hipolipidémicos y su capacidad de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Ghatak y Pamchal. Gamma-oryzanol – A multi-purpose steryl ferulate. Curr Nutr & Food Sci; 2011; 7:10-20), por paliar los síntomas menopáusicos (Ishihara y col. Clinical effect of gamma-oryzanol on climacteric disturbance on serum lipid peroxides. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi; 1982; 34:243-51), y como agente antidiabético (Imam y col. Antidiabetic properties of germinated Brown rice: a systematic review, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2012;DOI: 10.1155/2012/816501), al que también se le han asociado propiedades anticancerígenas (Hirose y col. Modifying effects of phytic acid and gamma-oryzanol on the promotion stage of rat carcinogenesis. Anticancer Res;1999; 9:3665-70).

35

- Por su parte, el GABA es un potente neurotransmisor y ejerce efectos beneficiosos para la salud como la regulación de la presión sanguínea y ritmo cardíaco, estimula la secreción de insulina contribuyendo a la prevención de la diabetes, alivia el dolor, la ansiedad y el insomnio (Patil y Khan. Germinated Brown rice as a value added rice product: A review. J. Food Sci. Technol; 2011;48:661-667). Se le ha asignado un papel importante en el aprendizaje y la memoria y se le ha asociado con la reducción del riesgo de enfermedad de Alzheimer (Mamiya y col. Effects of pre-germinated Brown rice on depression-like behaviour in mice. Pharmacol. Biochem. Behav; 2007;86:62-67).
- Por todo lo anteriormente expuesto, existe un interés creciente por conseguir alimentos y/o preparados alimenticios o cosméticos enriquecidos en γ -orizanol y GABA y la bibliografía científica muestra que el arroz integral germinado es una excelente fuente natural de estos compuestos, de fácil preparación y de atractivo consumo (Wu y col. Germinated brown rice and its role in human health. Cri. Rev. Food Sci. Nutr; 2013;53:451-463).
- Las referencias científicas referentes a las variaciones en el contenido en γ -orizanol durante la germinación de arroz integral no son coincidentes. Esto parece principalmente debido a las diferencias entre variedades y entre los principales parámetros de germinación, a saber, tiempo, temperatura y cantidad de agua utilizada durante el proceso, encontrándose trabajos en los que el contenido de este compuesto aumenta, se mantiene e incluso disminuye como consecuencia del proceso (Moongngarm y Saetung. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rice and Brown rice. Food Chem; 2010; 122:782-88; Jayadeep y Malleshi. Nutrients, composition of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol, and antioxidant activity in brown rice before and after biotransformation. CyTA. Journal of Food. 2011; 9:82-87; Kim y col. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. Food Chem; 2012;134:288-293). En cambio, los datos encontrados en la bibliografía hasta la fecha sobre el efecto de la germinación en el contenido en GABA de arroz integral son bastante coincidentes e indican que generalmente este compuesto se incrementa con el tiempo de germinación (Cáceres y col. Maximizing the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. Food Chem; DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.156.).
- La germinación del arroz comienza con la hidratación de la semilla, momento en el que se produce la reactivación del metabolismo y la hidrólisis de proteínas y carbohidratos de

reserva, a la vez que se sintetizan y acumulan nuevos metabolitos, algunos de ellos beneficiosos para la salud. El contenido de estos compuestos bioactivos, por tanto, va a depender de las condiciones de germinación.

5 EXPLICACION DE LA INVENCION

El primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener granos de arroz integral y/o productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos, caracterizado por que comprende:

10

a) en presencia de luz, germinar granos de arroz integral durante un período de tiempo de entre 20 y 120 h y a una temperatura de entre 25 y 34 °C.

15

Los compuestos biológicamente activos se eligen de entre compuestos con actividad antioxidante y/o compuestos con actividad antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva, que preferentemente son γ -orizanol y ácido gamma-aminobutírico (GABA).

20

En una realización particular, en el paso a) el tiempo es 24 horas, la temperatura es 28° C y el γ -orizanol comprende un contenido superior a 14 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado y un contenido de GABA superior a 23 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado.

25

El segundo objeto de la invención se refiere al producto obtenido por el procedimiento, preferentemente, granos de arroz integral germinado o una harina obtenida a partir de los granos de arroz.

30

El tercer objeto de la invención se refiere al uso del producto obtenido por el procedimiento, en la elaboración de composiciones alimentarias saludables.

El cuarto objeto de la invención se refiere al uso del producto obtenido por el procedimiento, en la elaboración de composiciones cosméticas.

El quinto objeto de la invención se refiere a las composiciones alimentarias saludables y/o a las composiciones cosméticas directamente obtenidas.

35 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la presente invención es conseguir la obtención de granos de arroz integral germinado y/o productos derivados de los mismos que presenten altos contenidos de compuestos biológicamente activos, notablemente incrementados con respecto al contenido de estos mismos compuestos en granos de arroz integral obtenidos por los procedimientos actualmente conocidos en el estado de la técnica.

Los inventores de la presente solicitud de invención han descubierto que la presencia de luz durante la germinación de granos de arroz integral es un parámetro de germinación que, sorprendentemente, permite obtener granos de arroz integral germinados con contenidos incrementados de γ -orizanol y GABA, que son notablemente superiores a los de los mismos granos de arroz germinados en ausencia de luz y a los de los mismos granos sin germinar (ver Ejemplos 3 y 4).

Las principales ventajas técnicas que presenta la invención que aquí se plantea son:

a) con respecto al procedimiento:

- es económico, sencillo y respetuoso con el medio ambiente,

-

b) con respecto al producto obtenido por el procedimiento: en el caso de los granos de arroz germinado, éstos pueden ser incluidos fácilmente en la dieta de los consumidores bien directamente en su estado natural fresco, o transformarse en harinas para su incorporación en la formulación de nuevos alimentos o en forma de alimentos de preparación instantánea.

Tal y como se indica en el apartado del estado de la técnica, es conocido el uso de procedimientos de germinación para aumentar el contenido de compuestos biológicamente activos. Sin embargo, y en el conocimiento de los inventores de la presente solicitud de patente, de entre los parámetros involucrados en la germinación, hasta la fecha no se había considerado el uso de la luz durante la germinación de las semillas de arroz integral para incrementar el contenido de compuestos biológicamente activos.

Constituye el primer objeto de la invención, un procedimiento para obtener granos de arroz integral y/o productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos, en adelante procedimiento de obtención de la invención, que comprende:

a) en presencia de luz, germinar granos de arroz integral durante un período de tiempo de entre 20 y 120 h, a una temperatura de entre 25 y 34 °C.

5 En la presente invención por “compuestos biológicamente activos” se entiende cualquier sustancia eficaz para el mantenimiento de la salud o para disminuir el riesgo de padecer enfermedades.

10 En un aspecto de la invención, el compuesto biológicamente activo es un antioxidante, y preferentemente es el γ -orizanol.

Por “ γ -orizanol” se entiende la mezcla de esteres de alcoholes triterpénicos del ácido ferúlico que se encuentran mayoritariamente en la cascarrilla integral del arroz, y al que se le han asociado propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud.

15 En otro aspecto de la invención, el compuesto biológicamente activo es un compuesto con actividad, a título indicativo y no limitativo, antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva, y preferentemente es el ácido gamma-aminobutírico.

20 Por “ácido gamma-aminobutírico o GABA” se entiende un aminoácido no proteico de relevante importancia como neurotransmisor cerebral, que se considera beneficioso para el buen mantenimiento de la salud y que actúa también como compuesto hipotensor, antidiabético y antidepresivo.

25 En el ámbito del procedimiento de la invención se incluye cualquier variedad de granos de arroz integral. Ejemplos de variedades de arroz que se utilizan en la invención son, aunque sin limitarse, variedades comerciales de *Oryza sativa* como, PRONACA SFL09, INIAP 14, INIAP 15, INIAP 17 y cultivar experimental GO39839.

30 En una realización particular, en el paso a) el tiempo es 24 horas, la temperatura es 28 °C y el γ -orizanol comprende un contenido superior a 14 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado y un contenido de GABA superior a 23 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado (ver FIG 1 y 2).

35 El procedimiento de obtención de la invención, cuando utiliza granos de arroz integral de la variedad SFL 09 y se lleva a cabo durante 24 horas a 28 °C, permite un incremento del γ -

orizanol del 30 % con respecto al mismo arroz sin germinar y del 57 % con respecto al mismo arroz germinado en ausencia de luz, y un incremento de GABA del 2500 % con respecto al mismo arroz sin germinar y del 92% con respecto al mismo arroz germinado en oscuridad.

5

Constituye el segundo objeto de la invención, el producto obtenido por el procedimiento de obtención de la invención, en adelante producto de la invención.

10 En un aspecto de la invención, el producto de la invención son los granos de arroz integral germinado, en adelante granos de arroz integral germinado de la invención, y/o los productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos.

15 Los granos de arroz integral germinado de la invención se consumen directamente como vegetal fresco lavado y limpio hasta tal punto que no requieren lavado adicional cuando se cocinan y admiten cualquier tipo de envasado, para venta de producto fresco, conservas (enlatados, encurtidos, entre otros), congelados o cualquier otra presentación de alimentos vegetales comestibles.

20 En la presente invención por "productos derivados" se entiende los granos de arroz integral germinado de la invención que sufren alguna transformación física o química, pero también a los extractos que comprenden los compuestos bioactivos presentes en los granos de arroz integral germinado o modificados.

25 Los granos de arroz germinado de la invención se deshidratan y se convierten en harinas siguiendo cualquier procedimiento convencional de los que se recogen en el estado de la técnica, y se utilizan como alimentos de preparación instantánea, harinas para rebozar o preparar alimentos de panadería o repostería, que adicionalmente son aptos para celíacos.

30 Los granos de arroz integral germinados de la invención y las harinas obtenidas a partir de los mismos, constituyen una fuente de compuestos bioactivos que se extraen de los mismos utilizando técnicas apropiadas, como las que por ejemplo se indican a título indicativo en los documentos CN102464696 A, CN103082171 A, JP2006111583 A2, JP5070361 B1.

35 En otro aspecto de la invención, el producto de la invención es un extracto que se obtiene a partir de los granos de arroz integral germinado de la invención o de las harinas obtenidas a partir de los mismos, que comprende γ -orizanol y/o GABA.

Constituye el tercer objeto de la invención, el uso del producto de la invención, en la elaboración de composiciones alimentarias saludables que lo comprenden.

5 Se entiende por “composiciones alimentarias saludables” aquellas preparaciones alimenticias sólidas o líquidas, incluyendo los suplementos alimenticios, ricas en compuestos biológicamente activos, preferentemente γ -orizanol y/o GABA, que adicionalmente al valor nutricional propio del arroz, promueven el buen estado de salud y bienestar de los consumidores, por su participación en la prevención y en el retraso en la aparición de patologías crónicas degenerativas como las hiperlipidemias, enfermedades
10 cardiovasculares, diabetes, obesidad, demencia, menopausia, depresión y cáncer.

El efecto saludable de los compuestos bioactivos γ -orizanol y/o GABA se recoge suficientemente en el apartado del estado de la técnica.

15 Ejemplos de composiciones alimentarias saludables son, aunque sin limitarse, platos preparados que comprenden carnes, vegetales, verduras, ensaladas y guarniciones; bebidas energéticas y fortalecedoras destinadas a poblaciones con necesidades específicas con el fin de conseguir su revalorización nutricional y funcional; productos cotidianos de rebozado, tempura, bollería, repostería, barritas energéticas, snacks, masas panarias,
20 pastas y productos relacionados; y sopas, purés y bebidas instantáneas.

Cuando las composiciones alimentarias saludables, son suplementos alimenticios, se presentan en forma de cápsulas, en forma liofilizada, en forma líquida, en forma de píldoras o en forma de geles que comprenden los compuestos bioactivos, que preferentemente son
25 γ -orizanol y/o GABA.

Constituye el cuarto objeto de la invención, el uso del producto de la invención, en la elaboración de composiciones cosméticas que lo comprenden.

30 Finalmente, constituye el quinto objeto de la invención, las composiciones alimentarias saludables y/o a las composiciones cosméticas que comprenden al producto de la invención.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros
35 aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la

descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Contenido en γ -orizanol (mg/100g). (A) harina seca de granos de arroz integral crudo; (B) harina seca de granos de arroz integral germinado obtenidos por el procedimiento de obtención de la invención durante 24 h a 28 °C; (C) harina seca de granos de arroz integrado germinado obtenidos en ausencia de luz.

Figura 2. Contenido en GABA (mg/100g). (A) harina seca de granos de arroz integral crudo; (B) harina seca de granos de arroz integral germinado obtenidos por el procedimiento de obtención de la invención durante 24 h a 28 °C; (C) harina seca de granos de arroz integral germinado obtenidos en ausencia de luz.

MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION

Ejemplo 1. Obtención de granos de arroz integral germinado de la invención utilizando el procedimiento de obtención de la invención

Para la obtención de los granos de arroz integral germinado de la invención se utilizó un arroz integral certificado comercial cultivar SFL 09 comercializado y distribuido por INDIA – PRONACA (Ecuador).

50 g de arroz integral se lavaron con agua destilada y a continuación se higienizaron con 250 mL de hipoclorito sódico al 0,1% durante 30 min. Después se escurrieron y se lavaron con agua destilada hasta pH neutro. Posteriormente, el arroz se sometió a germinación en la misma cantidad de agua destilada (relación 1:5 p/v) y se mantuvo durante 24 horas a 28 °C en presencia de luz.

Transcurrido ese tiempo, los granos de arroz integral germinado de la invención se escurrieron y se liofilizaron.

Ejemplo 2. Obtención de granos de arroz integral germinado utilizando un procedimiento de germinación en ausencia de luz.

Se reprodujeron idénticas condiciones a las indicadas en el Ejemplo 1, pero en este caso la germinación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad.

Ejemplo 3. Análisis de γ -orizanol por HPLC en los granos de arroz integral germinado obtenidos según los Ejemplos 1 y 2, y en el mismo arroz integral sin germinar

La extracción de γ -orizanol de muestras obtenidas según los Ejemplos 1 y 2 se realizó con metanol 100% (relación 1:10, p/v), como control se utilizó el arroz integral sin germinar, en adelante crudo. Para ello, 2 g de la harina seca de arroz correspondiente obtenida mediante liofilización se combinaron con 20 mL de metanol y se agitaron en vortex durante 2 min. Posteriormente se centrifugaron a 4500xg, 10 min, a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante y el residuo se sometió a extracción en las mismas condiciones dos veces más. Los sobrenadantes se unieron y se concentraron a sequedad en rotavapor, a 35 °C. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de metanol, se filtró a través de membranas de 0,22 μ m y se analizó su contenido por HPLC. El sistema cromatográfico consistió en un módulo de separación Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) equipado con una columna C18 (150 x 3,9 mm id, 5 μ m) (Waters) termostatzada a 25 °C y un detector de diodos alineados 2996 (Waters) a 325 nm. Se inyectaron 20 μ L de muestra y la separación se realizó a un flujo de 1 mL/min mediante la elución del siguiente gradiente formado por fase móvil A acetonitrilo grado HPLC, fase móvil B metanol grado HPLC y fase móvil C agua bi-destilada con el gradiente que se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de elución para el análisis de γ -orizanol por HPLC

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
0	60	35	5
5	60	35	5
8	60	40	0
10	60	40	0
20	22	78	0
35	22	78	0
45	60	35	5
50	60	35	5

La identificación se realizó comparando la longitud de onda de máxima absorción y espectro de masas con un patrón comercial de γ -orizanol (Cymit, España). La cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado con el mismo patrón comercial en un rango de concentraciones entre 5-150 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 > 0.990$).

5

Ejemplo 4.- Análisis de GABA en los granos de arroz integral germinado obtenidos según los Ejemplos 1 y 2, y en el mismo arroz integral sin germinar

La extracción de GABA de las muestras obtenidas según los Ejemplos 1 y 2 se realizó en agua destilada (relación 1:20, p/v), como control se utilizó el arroz integral crudo. Para ello, 500 mg de la harina seca de arroz correspondiente obtenida mediante liofilización se combinaron con 12 mL de agua y la mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante la noche. Posteriormente se centrifugaron a 32500xg, 10 min, a 5 °C. Del sobrenadante se tomaron 50 μL y se liofilizaron, a los que se adicionó 10 μL de patrón interno alil-glicina (1,2 mg/mL) y 20 μL del reactivo mezcla metanol:agua:triethylamina (1:1:0,5). La mezcla se agitó vigorosamente en vortex y se concentró a sequedad. A continuación se añadieron 30 μL del reactivo mezcla formado por MetOH: fenilisotiocianato:triethylamina:agua (7:1:1:1) y se dejó reaccionar 20 min a temperatura ambiente. A continuación se procedió a su concentración a sequedad y su posterior disolución en fase móvil A formada por acetato amónico 0.1 M, pH 6.5, mezcla vigorosa en vortex y centrifugación a 32500xg durante 5 min. Posteriormente, la muestra se filtró a través de membrana de 0,22 μm y se analizó su contenido por HPLC. El sistema cromatográfico consistió en un módulo de separación Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) equipado con una columna Columna Alltima C18 (5 μm , 250 x 4.6 mm) precedida por una Precolumna Alltima C18 (5 μm , 7.5 x 4.6 mm) termostaticada a 43 °C y un detector de diodos alineados 2996 (Waters) a 242 nm. Se inyectaron 20 μL de muestra y la separación se realizó a un flujo de 0,7 mL/min mediante la elución del siguiente gradiente formado por fase móvil A acetato amónico 0,1 M, pH 6.5 y fase móvil B acetato amónico 0,1 M-acetonitrilo-metanol pH 6.5 con el gradiente que se indica en la Tabla 2.

30 Tabla 2. Gradiente de elución para el análisis de GABA por HPLC

35

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
15	90	100
40	60	40
42	0	100
48	0	100
49	100	0
53	100	0

La identificación se realizó comparando la longitud de onda de máxima absorción y espectro de masas con un patrón comercial de GABA (Sigma, España). La cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado interna y externa con el mismo patrón comercial (alil-glicina y GABA, respectivamente) en un rango de concentraciones entre 15-240 µg/mL ($r^2 > 0.990$).

5

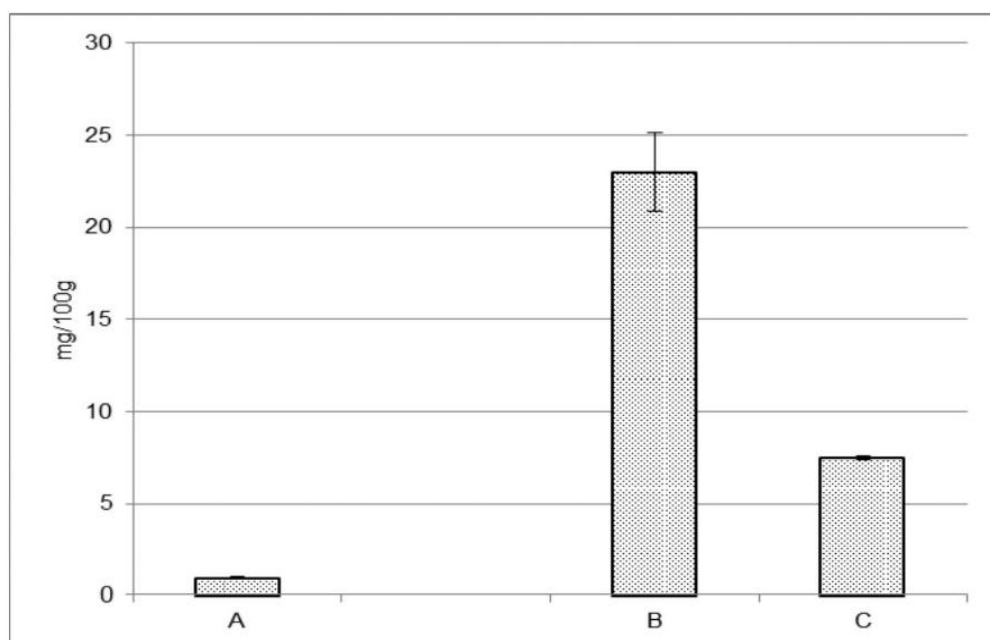
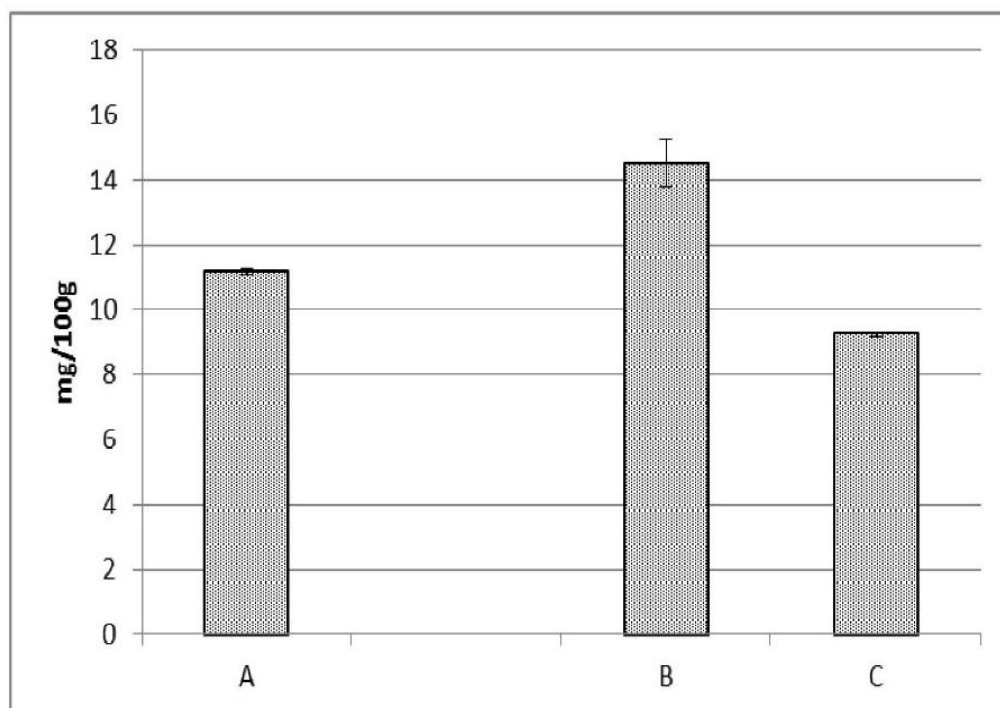
REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para obtener granos de arroz integral y/o productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos, caracterizado por que comprende:
- a) en presencia de luz, germinar granos de arroz integral durante un período de tiempo de entre 20 y 120 h y a una temperatura de entre 25 y 34°C.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los compuestos biológicamente activos se eligen de entre un compuesto con actividad antioxidante y/o un compuesto con actividad antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el compuesto con actividad antioxidante es γ -orizanol.
- 20 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, caracterizado por que el compuesto con actividad antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva es ácido gamma-aminobutírico.
- 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en el paso a) el tiempo es 24 horas y la temperatura 28 °C.
- 25 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que el γ -orizanol comprende un contenido superior a 14 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado y un contenido de ácido gamma-aminobutírico superior a 23 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado.
- 30 7.- Producto obtenido por el procedimiento tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 8.- Producto según la reivindicación 7, que son granos de arroz integral germinado.
- 35 9.- Producto según la reivindicación 7, que es una harina que se obtiene a partir de los granos de arroz integral germinado según la reivindicación 8.

10.- Uso del producto tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la elaboración de composiciones alimentarias saludables.

11.- Uso del producto tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9,
5 en la elaboración de composiciones cosméticas.

12.- Composiciones alimentarias saludables y/o composiciones cosméticas obtenidas tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.



RESUMEN

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GRANOS DE ARROZ INTEGRAL GERMINADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS MISMOS QUE COMPRENDEN COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

5

La presente invención se refiere a un procedimiento sencillo y económico de germinación que, utilizando luz, permite obtener granos de arroz integral germinado y/o productos derivados de los mismos con altos contenidos de compuestos biológicamente activos, preferentemente γ -orizanol y GABA. Los granos de arroz integral germinado obtenidos o los

10

productos derivados de los mismos se utilizan en la elaboración de composiciones alimentarias o cosméticas, que adicionalmente a su valor nutricional, comprenden un alto contenido en compuestos bioactivos saludables, que los hacen recomendables tanto para una alimentación completa, como para la prevención y/o disminución del riesgo de aparición de patologías crónicas degenerativas.

4.2. Utilización de arroz integral germinado en la elaboración de panes para personas con necesidades nutricionales especiales.

La demanda de alimentos saludables, de alto valor nutritivo y sin gluten ha suscitado el interés por la utilización de cereales alternativos al trigo en los productos de panadería. Las harinas sin gluten más comúnmente utilizadas en la industria son las harinas de arroz refinadas (Hager y col., 2012). La producción de productos de panadería basados en harina de arroz presenta varios problemas tecnológicos en comparación al trigo, debido a la ausencia de las proteínas del gluten que aportan la capacidad única de formar productos de panadería esponjosos, tiernos y con un excelente sabor y aroma. La literatura recoge varias aproximaciones utilizadas para la obtención de panes de arroz sin gluten con un óptimo volumen de expansión y características organolépticas. La adición de hidrocoloides (Sivaramakrishnan y col., 2004) y la aplicación de tratamientos de extrusión (Martínez y col., 2014) se han propuesto como estrategias para mejorar las propiedades tecnofuncionales de la harina de arroz.

La harina de arroz integral germinado, rica en fibra y compuestos bioactivos, se perfila como una alternativa a la harina de arroz refinada más saludable, nutritiva y económicamente viable para la elaboración de productos sin gluten. Por esta razón, otro de los objetivos del presente estudio fue desarrollar un pan de harina de arroz integral sin gluten. Hasta el momento, existen evidencias que indican que la sustitución parcial de la harina de trigo con harina de arroz integral germinado hasta un 50% presenta algunas ventajas como la mejora de la textura, esponjosidad del pan así como el retraso en su endurecimiento (Watanabe y col., 2004; Charoenthaikij y col., 2010; Charoenthaikij y col., 2012). Más recientemente, otros autores han hecho posible la elaboración de pan sin gluten con formulaciones de harina de arroz integral germinado 100% (Cornejo y Rosell, 2015). En este estudio se demuestra que el tiempo de germinación del arroz integral tiene un efecto significativo en las propiedades tecnofuncionales de la harina y, consecuentemente, en la calidad organoléptica del pan resultante. Con el objetivo de profundizar en las investigaciones recogidas en la bibliografía, nos planteamos estudiar el efecto del tiempo de germinación del arroz integral en el valor nutricional, en compuestos bioactivos y actividad antioxidante de pan sin gluten (Publicación III).

Para ello, se seleccionó la variedad de arroz integral INIAP15 por dar lugar a harinas más ricas en GABA, polifenoles totales y con mejores propiedades tecnofuncionales para la elaboración de pan, una vez germinada en las condiciones óptimas. El arroz integral se sometió a remojo durante 24 h a 28 °C y posterior germinación durante 12, 24 y 48 h a dicha temperatura y se estudió el efecto de pre-germinación y el tiempo de germinación en la composición proximal, digestibilidad del almidón y la proteína, contenido de ácido fólico, GABA, polifenoles, γ -orizanol y actividad antioxidante del pan elaborado.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de una publicación:

Publicación III. Efecto de la germinación en el valor nutritivo y los compuestos bioactivos de pan de arroz integral.

Publicacion III. Efectos de la germinación en el valor nutritivo y los compuestos bioactivos de pan de arroz integral.

Fabiola Cornejo, Patricio J. Caceres, Cristina Martínez-Villaluenga, Cristina M. Rosell, Juana Frias. Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of brown rice breads. 2015. Food Chemistry 173(0): 298-304.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de las condiciones de germinación sobre los beneficios nutricionales de panes especiales elaborados con harina de arroz integral germinado. Para alcanzar dicho objetivo se evaluó la composición proximal, el contenido en ácido fítico, la digestibilidad de la proteína y el almidón, el índice glucémico, el contenido de glucosa libre y almidón, así como los compuestos bioactivos más relevantes (GABA, γ -orizanol y compuestos fenólicos totales) y la actividad antioxidante de los panes preparados con harina de arroz integral INIAP15 pre-germinado durante 24 h a 28 °C y posteriormente germinado a la misma temperatura a diferentes tiempos (12, 24 y 48 h).

Cuando se comparó los panes de harina de arroz integral germinada a distintos tiempos se observó que la germinación durante 48 h dio lugar a un pan de calidad nutricional superior por su mayor contenido de proteína, grasa y compuestos bioactivos (GABA y compuestos polifenoles totales), actividad antioxidante así como un contenido reducido de ácido fítico y menor índice glucémico. Se detectó, a su vez, una ligera disminución en la digestibilidad de la proteína y del contenido en γ -orizanol del pan de harina de arroz integral germinado durante 48 h comparado con el pan de arroz integral no germinado. En conclusión, la germinación parece ser un proceso natural, económico y sostenible para mejorar la calidad nutricional de los panes elaborados con harina de arroz integral, que además, no contienen gluten.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of brown rice breads



Fabiola Cornejo^{a,b,1}, Patricio J. Caceres^{b,c,1}, Cristina Martínez-Villaluenga^c, Cristina M. Rosell^{a,*}, Juana Frias^c

^a Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), Avenida Agustín Escardino, 7, Paterna 46980, Valencia, Spain

^b Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

^c Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2014

Received in revised form 28 July 2014

Accepted 7 October 2014

Available online 14 October 2014

Keywords:

Brown rice
Germination
Nutritive value
Gluten free

ABSTRACT

The effect of germination conditions on the nutritional benefits of germinated brown rice flour (GBR) bread has been determined. The proximate composition, phytic acid, *in vitro* protein digestibility and *in vitro* enzymatic hydrolysis of starch, glucose and starch content, as well as the most relevant bioactive compounds (GABA, γ -oryzanol and total phenolic compounds) and antioxidant activity of breads prepared with GBR at different germination conditions was determined. When comparing different germination times (0 h, 12 h, 24 h and 48 h), germination for 48 h provides GBR bread with nutritionally superior quality on the basis of its higher content of protein, lipids and bioactive compounds (GABA and polyphenols), increased antioxidant activity and reduced phytic acid content and glycaemic index, although a slight decrease in *in vitro* protein digestibility was detected. Overall, germination seems to be a natural and sustainable way to improving the nutritional quality of gluten-free rice breads.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the last decade, the use of brown rice (BR) has increased in both standard diets and in those diets catered to people with celiac disease or allergies to other cereals. In addition, the germination of BR grains provides higher nutritional and functional values since they are associated with the quality and quantity of their nutrients, biologically active compounds and antioxidant potential. Currently consumers demand natural foods, and sprout products have become increasingly popular among people interested in improving and maintaining their health by changing dietary habits. In this scenario, sprouted BR grains are excellent examples of functional food, because besides their nutritive value they lower the risk of various diseases and/or exert health promoting effects.

Germinated brown rice (GBR) is considered as a gluten-free grain characterised by an excellent nutrient profile and germination greatly enhances the content of bioactive compounds, such as GABA (γ -aminobutyric acid), phenolic compounds, γ -oryzanol and the antioxidant activity (Caceres et al., 2014). For instance, while the consumption of rice is associated with diabetes mellitus

due to its high glycaemic index, GBR takes a leading role against diabetics and at the same time, a reduction on phytic acid is achieved enhancing mineral availability (Kim et al., 2012).

Scientific research supports the beneficial effects of these bioactive compounds, which includes regulation of blood pressure and heart rate, alleviation of pain and anxiety, improves sleeplessness and autonomic disorders associated with menopausal or presenile periods, suppresses liver damage, inhibits cancer cell proliferation and protects against oxidative stress (Oh & Oh, 2004). In Japan, GBR was launched to the market in 1995. Since then, the popularity of GBR is increasing within the Japanese population and, simultaneously, numerous derived food products have increased. Consequently, the use of GBR as a functional ingredient has caught the attention of researchers studying changes in nutritional composition and bioactivity. Thus, there is an increasing trend focusing on the use of GBR in the formulation of high quality health products. In this scenario, GBR is used as a raw material for obtaining different food products, like GBR balls, soup, bread, doughnuts, cookies and rice burgers (Ito S, 2004).

Bread is a staple food in many parts of the world providing most calories in the diet. Bread is mostly prepared from wheat flour, which makes it unsuitable for people suffering from celiac disease patients, which is a lifelong disorder with a prevalence of 1% of the

* Corresponding author. Tel.: +34 963900022; fax: +34 963636301.

E-mail address: crorell@iata.csic.es (C.M. Rosell).

¹ These authors have made equal contribution to the work.

world population. The only acceptable treatment is the restriction of gluten from the diet and, therefore, GBR bread is an attractive healthy alternative for this group of patients. The availability of palatable BR-containing gluten-free products would represent a significant advance towards ensuring an adequate intake of nutrients and bioactive compounds, mostly for subjects with celiac disease, but also for general consumers. Accordingly, developing bread based on GBR with desirable nutritional quality and providing bioactive compounds is worthy of investigation.

To date, experimental GBR breads have been characterised with adequate instrumental and sensory attributes (Cornejo & Rosell C.M., 2014). However, to our knowledge, investigations on the effect of germination conditions on the nutritive composition of BR-bread are very limited. Therefore, the aim of the present study was to assess the proximate composition, phytic acid content, *in vitro* protein digestibility and *in vitro* enzymatic hydrolysis of starch, glucose and starch, as well as the most relevant bioactive compounds (GABA, γ -oryzanol and total phenolic compounds) and antioxidant activity of breads prepared with GBR at different germination conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercial certified BR cultivar INIAP 15 was provided by the National Institute of Agricultural Research from Ecuador (INIAP). Seeds were harvest between May and December 2011. The gluten-free bread formulations also contained compressed yeast (LEVAPAN, Lessaffre, Valladolid, Spain) and hydroxypropylmethylcellulose (Methocel K4M) obtained from Dow Chemical Company (Michigan, USA).

2.2. Germination and flour preparation

Brown rice was sterilized with 0.1% sodium hypochlorite solution (1:5 w/v) for 30 min, and then rinsed with distilled water. Afterwards, rice was soaked in distilled water (seed water ratio, 1:5, w/v) for 24 h at $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Soaking water was drained and the rinsed seeds were placed into plastic trays containing moist filter paper and were also covered with paper. The filter papers were kept wet by capillarity. Germination was carried out at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ and 100% relative humidity under darkness for 12, 24 and 48 h. Germination period was selected on the basis of preliminary assays where nutritional pattern was followed in parallel to technological functionality of flours. After germination, seeds were dried at $50 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h. Once dried, seeds were ground with a diameter inferior to 1 mm with a cyclone mill (UDY Corporation, USA). Brown rice flour was also obtained for comparison purposes, besides flour from soaked rice without germination. Two sets of samples were prepared for each treatment.

2.3. Bread preparation

The dough was prepared using the recipe of Marco and Rosell (2008). Half of the rice flour was mixed with boiling water (half of the water) and mixed for five minutes. The dough was left to rest until the temperature decreased to 30°C . Then, the remaining flour, the other ingredients and water were added and mixed for 5 min. The dough was put into pans and fermented for 40 min at 35°C and 85% RH. Finally, the fermented dough was baked for 35 min at 175°C . The bread was analysed after 24 h of baking. Bread samples were coded BR for breads made with unprocessed BR flour, Pre-GBR for breads made with soaked brown rice and GBR preceded with germination time for those germinated brown rice flour (e.g. 12 h GBR for GBR germinated for 12 h).

2.4. Nutritional composition

Chemical composition of gluten-free breads was determined following AOAC (2005) methods, which included: moisture (method 925.10), ash (method 923.03), fat (method 922.06) and protein (method 920.87). The carbohydrate content of the samples was calculated by subtracting the sum of grams of moisture, protein, fat and ash from 100 g of bread. The components were converted to food energy using conversion factors (4.0 kcal g^{-1} for proteins and carbohydrates and 9.0 kcal g^{-1} for fats) (FAO, 2003).

2.5. Determination of phytic acid

An accurate photometrical Haug and Lantzsch's determination of phytic acid phosphorus was used (Reichwald & Hatzack, 2008) with some modifications. One ml of 1 M HCl was added to 50 mg of a sample in an airtight stoppered vial and heated for 1 h in a glycerol bath at 80°C under constant agitation at $10\times\text{g}$. The mixture was then cooled to room temperature and centrifuged at $10,621\times\text{g}$ for 5 min and 0.250 ml of the supernatant was diluted with 1 ml of distilled water. An aliquot of 0.4 ml of sample, standard (phytic acid solution in 0.2 M HCl) or blank (0.2 M HCl) were added to 0.8 ml of ferric solution (0.05 g of FeCl_3 in 500 ml of 0.2 M HCl) in an airtight stoppered vial and was heated for 1 h in a glycerol bath at 80°C with agitation at $10\times\text{g}$. The mixture was cooled in an ice bath for 15 min and centrifuged at $10,621\times\text{g}$ for 5 min at room temperature. Aliquot of 0.6 ml of the supernatant was added to 0.8 ml of the complexing reagent (0.5 g of 2,2'-bipyridine and 65 μl of thioglycolic acid dissolved in 50 ml of 0.2 M HCl) and absorbance was read at 540 nm using a microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) controlled by the Gene 5TM software version 1.1. (BioTek Instruments).

2.6. *In vitro* protein digestibility

The *in vitro* protein digestibility of the samples was determined by the modified method of Hsu, Vavak, Satterlee, and Miller (1977). Briefly, 50 ml of aqueous protein suspension containing 6.25 mg protein/ml was prepared. Then, samples were placed in a 37°C water bath and the pH was adjusted to 8.00 using 0.1 M NaOH and/or 0.1 M HCl, while stirring. Trypsin at a concentration of 1.6 mg/ml was maintained in an ice bath and the pH was adjusted to 8.00 with 0.1 M NaOH and/or 0.1 M HCl. Five millilitres of enzyme solution were then added to the protein suspension, which was kept stirred at 37°C . The trypsin had an activity of 13,766 BAEE units/mg protein. The pH drop was recorded at 15 s after enzyme addition and at one minute intervals for 10 min. The enzyme solution was always freshly prepared before each series of experiments. The percent protein digestibility (Y) was calculated by using Eq. (1) (Hsu et al., 1977):

$$Y = 210.464 - 18.1x, \quad (1)$$

where x is the change in pH after 10 min.

2.7. *In vitro* starch digestibility and expected glycaemic index

Starch digestibility of bread was determined from dried samples, following the method previously described (Dura, Blaszcak, & Rosell, 2014) with minor modifications. Briefly, for free sugars removal, powdered sample (0.1 g) suspended in 2 ml of 80% ethanol was kept in a shaking water bath at 85°C for 5 min, and then centrifuged for 10 min at $1000\times\text{g}$. The remaining pellet was incubated with porcine pancreatic α -amylase (6 U/ml) (Type VI-B, ≥ 10 units/mg solid, Sigma Chemical, St. Louis, USA) in 10 ml of 0.1 M sodium maleate buffer (pH 6.9) in a shaking water bath at 37°C . Aliquots of 200 μl were withdrawn during the incubation

period and mixed with 200 μ l of ethanol (96%, w/w) to stop the enzymatic reaction and the sample was centrifuged at 10,000 \times g for 5 min at 4 °C. The precipitate was washed twice with 50% ethanol (200 μ l) and the supernatants were pooled together and kept at 4 °C for further glucose enzymatic release.

Supernatant (100 μ l) was diluted with 850 μ l of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and incubated with 50 μ l amyloglucosidase (33 U/ml) at 50 °C for 30 min in a shaking water bath. After centrifuging at 2000 \times g for 10 min, the supernatant was retained for glucose determination.

The glucose content was measured using a glucose oxidase-peroxidase (GOPD) kit (Megazyme, Dublin, Ireland). The absorbance was measured using an Epoch microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, USA) at 510 nm. Starch was calculated as glucose (mg) \times 0.9. The rate of starch digestion was expressed as a percentage of the total starch hydrolysed at different times (30, 60, 90, 120, 150 and 180 min). Replicates ($n = 4$) were carried out for each determination. A non-linear model established by Goni, Garcia Alonso, and Saura Calixto (1997) was applied to describe the kinetics of starch hydrolysis. The first order Eq. (2) has the form:

$$C = C_{\infty}(1 - e^{-kt}), \quad (2)$$

where C corresponds to the percentage of starch hydrolysed at time t , C_{∞} is the equilibrium percentage of starch hydrolysed after 180 min, k is the kinetic constant and t is the time (min). The parameters C_{∞} and k were estimated for each treatment.

Using the hydrolysis curve (0–180 min), hydrolysis index (HI) was obtained by dividing the area under the hydrolysis curve of the sample by the area of standard material obtained for white bread. The expected glycemic index (eGI) was calculated using the equation described by Granfeldt, Björck, Drews, and Tovar (1992): $eGI = 8.198 + 0.862HI$.

2.8. Determination of γ -aminobutyric acid (GABA)

γ -Aminobutyric acid (GABA) content was determined by HPLC as described in Caceres et al. (2014). Fifty μ l aliquots of concentrated water-soluble extract and 10 μ l allyl-L-glycine solution (Sigma–Aldrich) used as internal standard were derivatized with 30 μ l phenyl isothiocyanate (PITC 99%, Sigma–Aldrich) and dissolved in mobile phase A for GABA analysis. An Alliance Separation Module 2695 (Waters, Milford, USA), a photodiode array detector 2996 (Waters) and Empower II chromatographic software (Waters) were used as the chromatographic system. Twenty microliters of sample was injected into a C18 Alltima 250 \times 4.6 mm i.d., 5 μ m size (Alltech) column equipped with a C18 guard column (Alltech), both thermostatted at 30 °C. The chromatogram was developed at a flow rate of 1.0 ml/min by eluting the sample with mobile phase A (0.1 M ammonium acetate, pH 6.5) and mobile phase B (0.1 M ammonium acetate, acetonitrile, methanol, 44:46:10, v/v/v, pH 6.5) as described by Caceres et al. (2014). Samples were independently analysed in triplicate and results are expressed as mg GABA/100 g.

2.9. Determination of γ -oryzanol

The analysis of γ -oryzanol in rice samples was performed according to Moongarm and Saetung (2010) by extraction in methanol, filtration, concentration and analysed by HPLC. The system consisted of an Alliance Separation Module 2695 (Waters, Milford, USA), a photodiode array detector 2996 (Waters) set at 325 nm and Empower II software (Waters). Twenty μ l were injected into a C18 column (150 \times 3.9 mm i.d., 5 μ m size, Waters) and the mobile phase consisting of solvent A (acetonitrile), solvent

B (methanol) and solvent C (bi-distilled water) was eluted at 1.0 ml/min for 50 min as follows: isocratic flow 60% A, 35% B and 5% C for 5 min, gradient flow 60% A and 40% B to 8 min, maintained at 60% A and 40% B for 10 min, and then gradient flow 22% A and 78% B to 20 min, maintained isocratically to 35 min, reverted to initial conditions to 45 min, and then isocratic conditions that were kept to equilibrate the column to 50 min. γ -Oryzanol in rice samples was identified by retention time and spiking the sample with a standard solution of γ -oryzanol from bran rice (Cymit, Spain) and the purity of peaks was confirmed by comparison of the spectra and by MS analysis. γ -Oryzanol content was quantified by percentage of peak area according to the calibration curve prepared with γ -oryzanol standard solutions. Replicates were independently analysed and results were expressed in mg γ -oryzanol/100 g.

2.10. Determination of total phenolic content

The Folin–Ciocalteu method was used for determination of total phenolic content (TPC) according to Caceres et al. (2014). The absorbance was measured at 739 nm using a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments) and TPC were quantified by external calibration using gallic acid (Sigma–Aldrich) as standard. Samples were independently analysed in triplicate and results are expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g.

2.11. Determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Antioxidant activity was determined by the method of oxygen radical absorbance capacity by fluorescence using an automatic multiplate reader (BioTek Instruments) at λ_{exc} 485 nm and λ_{em} 520 nm as described recently in Caceres et al. (2014). Individual samples were analysed in triplicate and results are expressed as mg of Trolox equivalents (TE)/100 g.

2.12. Statistical analysis

Standardised skewness and standardised kurtosis analyses were made to verify normal distribution of the data. Multiple sample comparison was conducted to evaluate significant differences among samples by analysis of variance (ANOVA) and multiple range tests. Fisher's least significant differences (LSD) test was used to describe means with 95% confidence ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion 16 (Statistical Graphics Corporation, UK).

3. Results and discussion

3.1. Effect of soaking and germination time on nutritional properties of BR bread

The chemical composition of gluten free bread from BR and non-germinated BR showed no significant difference, with exception of ash content that was significantly lower in the bread from soaked flour, likely due to the loss of minerals during washing (Table 1). The chemical composition of the gluten free breads agrees with values reported by Matos and Rosell (2011) in commercial gluten free breads. It can be seen that germination increased the protein content and decreased the carbohydrate content, but that effect was independent of the germination time of the grains. In addition, a progressive reduction of ash content was observed with germination time. Regarding the fat content, a progressive decrease was observed up to 24 h of germination, but after that a significant increase was observed. There was a significant increase of free glucose content as germination proceeded, likely due to sugars released during germination. In fact, some

Table 1

Proximate composition, energy, free glucose and phytic acid content of gluten-free bread from raw (BR), pre-germinated (Pre-GBR) and germinated brown rice (GBR) at different times.

Treatment	Moisture (g/100 g)	Total protein (g/100 g)	Fat (g/100 g)	Carbohydrates (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Energy (kcal)	Free Glucose (g/100 g)	Phytic acid (g/100 g)
BR	49.77 ± 2.15a	6.03 ± 0.05c	6.96 ± 0.05b	74.19 ± 0.91a	2.85 ± 0.01a	214 ± 9b	0.29 ± 0.02d	1.09 ± 0.05c
Pre-GBR	50.08 ± 1.40a	6.12 ± 0.04c	6.74 ± 0.04c	74.20 ± 1.01a	2.42 ± 0.03d	213 ± 6b	0.31 ± 0.02d	0.82 ± 0.06a
12 h GBR	50.46 ± 1.72a	8.14 ± 0.21a	6.50 ± 0.06d	72.45 ± 1.18b	2.65 ± 0.04b	210 ± 7b	0.39 ± 0.03c	0.82 ± 0.08a
24 h GBR	49.98 ± 0.75a	8.01 ± 0.08ab	5.58 ± 0.03e	73.74 ± 0.55ab	2.52 ± 0.03c	209 ± 3b	0.52 ± 0.04b	0.95 ± 0.02b
48 h GBR	44.45 ± 1.49b	7.81 ± 0.12b	7.72 ± 0.04a	72.49 ± 0.51b	2.35 ± 0.05e	230 ± 1a	0.97 ± 0.02a	0.81 ± 0.02a

Values with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

researches have observed a reduction in starch contents and an increase in reducing sugar contents during germination due to degradation of the starch by enzyme activity (Charoenthaikij, Jangchud, Jangchud, Prinyawiwatkul, & No, 2012; Xu, Zhang, Guo, & Qian, 2012). During germination, enzymes become active and α -amylase activity increases, catalysing starch degradation, and consequently increasing the amount of small dextrin and fermentable sugars. Despite the fermentable sugars which are used by yeast during bread fermentation, the results revealed that significant differences were observed between the flour used.

A reduced phytic acid content was observed in bread when BR was submitted to steeping and germination processes ($P \leq 0.05$) (Table 1). A higher phytic acid reduction was reached at 12 and 48 h of BR germination (25%) than at 24 h (13%) ($P \leq 0.05$). Lower phytic acid content observed in bread from pre-germinated and GBR could be explained by leaching of this compound into the soaking water and activation of endogenous phytase activity during germination that provides myoinositol and phosphoric acid for seedling growth (Albarracín, González, & Drago, 2013). Phytic acid has the ability to chelate minerals (iron, zinc, magnesium and calcium) and negatively affects the absorption of amino acids, proteins and starch (Oatway, Vasanthan, & Helm, 2001). Previous studies have demonstrated that reduced phytic acid content achieved by rice soaking and germination treatment lead to improved protein digestibility and mineral digestibility (Albarracín et al., 2013). Therefore, germination of BR provides bread with better nutritional quality on the basis of its reduced phytic acid content compared to control bread. In addition, there is increasing evidence that phytic acid may be beneficial to human health as it reduces cholesterol levels in diabetic KK mice (Lee et al., 2005) and exerts antioxidant and anticarcinogen effects (Schlemmer, Fröllich, Prieto, & Grases, 2009).

3.2. Effect of soaking and germination time on *in vitro* protein digestibility of BR bread

Considering that germination activates enzymes like amylases, proteases and so on, protein digestibility was tested to determine if germination might improve protein digestibility of the resulting breads. Germination affected *in vitro* protein digestibility (Fig. 1, panel A), inducing an increase that was significant in breads obtained from rice after 12 h germination (12 h GBR), but further germination led to a significant reduction in protein digestibility. Bread samples 24 h GBR and 48 h GBR showed a slower decline in pH compared with other treatments (Fig. 1, panel A). It has been reported that BR germination increases albumin and decreased globulin and gliadin content, improving protein bioavailability (Zheng, Li, & Ping, 2007). In addition, germination increases the amount of free amino acid, especially GABA content (Velupillai, Nithyanantharajah, Vasantharuba, Balakumar, & Arasaratnam, 2009). Divergences with the results obtained in the present study might be attributed to the participation of lysine containing

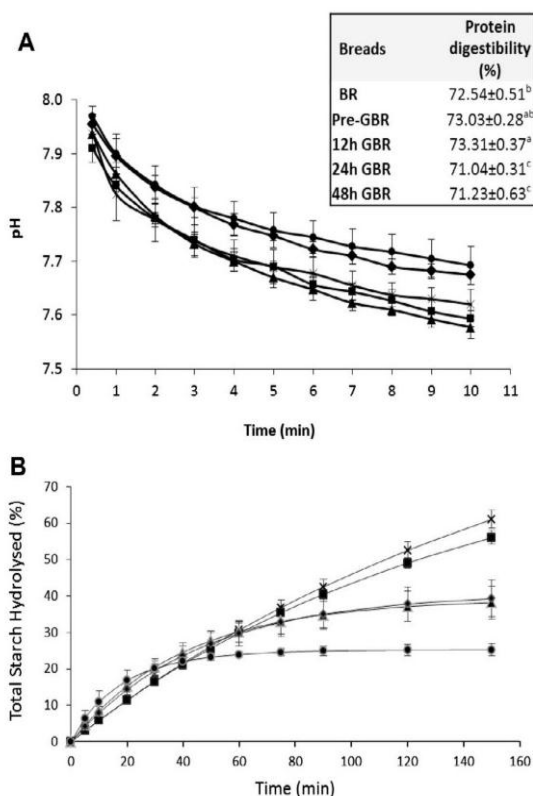


Fig. 1. *In vitro* digestibility of proteins (A) and starch (B) of gluten free bread from raw (BR), pre-germinated (Pre-GBR) and germinated brown rice (GBR) at different times (12, 24 and 48 h). BR (*), Pre-GBR (■), 12 h GBR (▲), 24 h GBR (◆), 48 h GBR (●). Values with different letters in the table inset are significantly different ($P \leq 0.05$).

proteins in the non-enzymatic browning (Maillard) reaction during baking, that is more accentuated in breads obtained from flours with extended germination (Cornejo & Rosell, 2014). In addition, the high temperature during baking could produce crosslinks between amino acids forming more rigid structures that reduce protein digestibility. Indeed, Lamberts, Joye, Beliën, and Delcour (2012) demonstrated that GABA was largely involved in Maillard reactions during baking, resulting in GABA trace levels in wheat bread samples.

3.3. Effect of soaking and germination time on *in vitro* starch digestibility of BR bread

The *in vitro* starch digestibility curves of gluten free breads are shown in Fig. 1 (panel B). In general, it can be observed that soaking and germination influenced the starch hydrolysis of the

gluten free bread. Presumably, germination gives some resistance to starch granules, likely due to the annealing that could undergo during soaking and drying. This result agrees with Xu et al. (2012) in germinated BR flour. They attributed the reduction of the digestion of starch to the presence of a more crystalline starch structure after germination, due to the fact that enzymes hydrolyse the amorphous regions first as they are easier to digest (Dura et al., 2014). In addition, considering that baking is a thermal treatment, Chung, Cho, Park, Kweon, and Lim (2012) demonstrated that hydrothermal treatment in GBR reduced starch digestibility. They attributed this effect to structural changes induced by heat-moisture treatment that provoked rigidity of starch granules and molecules, which are less susceptible to the action of digestive enzymes. No significant difference could be observed between 12 h GBR and 24 h GBR, but the effect was even more accentuated after 48 h of germination, slowing down starch hydrolysis.

The parameters extracted from the regression curves of the recorded *in vitro* starch digestibility are shown in Table 2. The end point values (C_{∞}) obtained from the hydrolysis process represent the concentration at the equilibrium point. The C_{∞} value of BR gluten free bread was within the values reported in other gluten free breads (de la Hera, Rosell, & Gomez, 2014; Matos & Rosell, 2011). A significant reduction of C_{∞} values as observed with germination, which reflected decreased digestibility of starch granules, indicating that germination led to less accessible or more resistant starch granules. In addition, k values significantly increased as germination time increases, reflecting structural differences (Butterworth, Warren, Grassby, Patel, & Ellis, 2012; Dura et al., 2014). Presumably, the action of α -amylase during germination changes the internal structure of the starch molecule making it more difficult to digest, as suggested by Xu et al. (2012) and Chung et al. (2012). An increase of k values by germination could be nutritionally unfavourable as low k values are related to a slow diffusion of pancreatic amylase into the starch granule as digestion proceeds. However, these k values are even lower than the ones reported by Matos and Rosell (2011) obtained in some commercial gluten free breads.

The hydrolysis index (HI) as well as the estimated glycaemic index (eGI) were significantly reduced with germination (Table 2), leading to breads with medium to low eGI. Indeed, the values of HI and eGI were lower than the ones reported for gluten free breads (de la Hera et al., 2014; Matos & Rosell, 2011). Usually, rice gluten free breads are expected to have higher GI (>70), due to the fact that these kinds of breads are mainly starchy foodstuff (Matos & Rosell, 2011). However, the varieties of the rice, as well as dough preparation, influence the *in vitro* starch digestibility (de la Hera et al., 2014; Frei, Siddhuraju, & Becker, 2003). The significant reduction of glycaemic index induced by the rice germination might be associated to the internal changes in the starch granules during germination. Low glycaemic index values are considered favourable to health, especially as a tool to prevent diseases where glycaemic control plays an important role, such as obesity, diabetes and hyperlipidemia.

Table 2

Kinetic parameters of the *in vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of gluten-free bread from raw (BR), pre-germinated (Pre-GBR) and germinated brown rice (GBR) at different times.

Treatment	C_{∞} (g/100 g)	k (min ⁻¹)	H_{90} (g/100 g)	HI	eGI
BR	96.81 ± 1.58a	0.006 ± 0.001c	36.66 ± 1.56b	60.21 ± 3.89a	60.10 ± 3.35a
Pre-GBR	81.23 ± 4.56b	0.007 ± 0.001c	44.84 ± 1.05a	56.63 ± 1.93a	57.01 ± 1.66a
12 h GBR	39.29 ± 4.84c	0.025 ± 0.005b	32.65 ± 3.68b	47.04 ± 5.53b	48.74 ± 4.77b
24 h GBR	40.88 ± 5.46c	0.022 ± 0.001b	32.86 ± 6.03b	46.42 ± 5.61b	48.22 ± 4.84b
48 h GBR	25.27 ± 1.63d	0.041 ± 0.006a	26.15 ± 0.68c	34.30 ± 0.91c	37.76 ± 0.79c

C_{∞} : equilibrium concentration of starch hydrolysed after 180 min, k : kinetic constant, H_{90} : starch hydrolysis at 90 min. Values with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

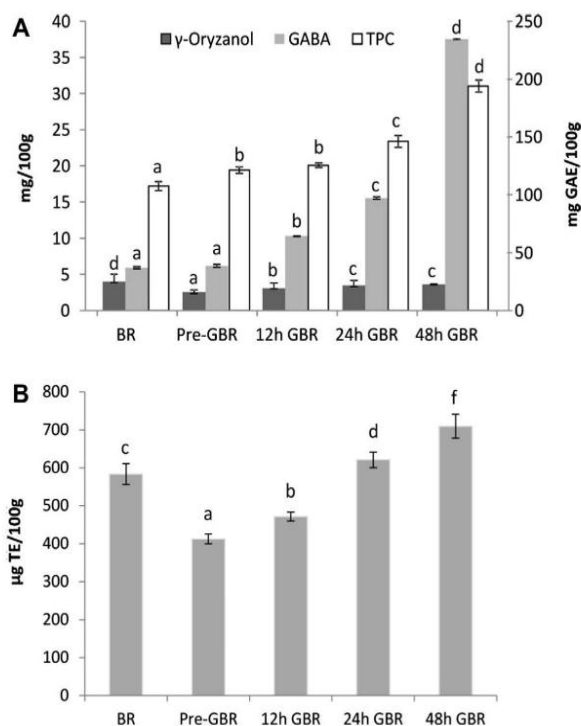


Fig. 2. GABA, γ -oryzanol and total polyphenol contents (TPC) (A); and antioxidant activity (B) of gluten free breads from brown rice (BR), pre-germinated brown rice (Pre-GBR) and germinated brown rice for 12 (12 h GBR), 24 (24 h GBR) and 48 h (48 h GBR). Error bars indicate standard deviation. Different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$, LSD test).

3.4. Effect of soaking and germination time on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of BR bread

The content of γ -oryzanol, GABA and TPC in BR bread (control) was 3.98, 5.92, 121.23 mg/100 g d.m., respectively (Fig. 2A). Breads from pre-germinated BR and GBR showed lower γ -oryzanol content than control breads ($P \leq 0.05$). Comparison of GBR breads showed that extended germination time (24 and 48 h) brought about increased γ -oryzanol content in breads, although levels reached were lower than those found in control bread ($P \leq 0.05$). Our results agree with studies showing a reduced γ -oryzanol concentration in pre-GBR and GBR (Kiing, Yiu, Rajan, & Wong, 2009). This effect could be attributed to increased feruloyl esterase activity involved in the hydrolysis of esters of phenolic acids, such as γ -oryzanol (esters of trans-ferulic acid), that results in the release of ferulic acid, as previously reported in barley (Sancho, Faulds, Bartolomé, & Williamson, 1999). On the contrary, several studies have shown that pre-germination for 48 h and germination of BR afford increased levels of γ -oryzanol (Moongnarm & Khomphiphatkul, 2011). These differences indicate that the effect of soaking and germination on γ -oryzanol content depends on

many factors, such as BR cultivar and processing conditions (time, temperature, water pH) (Kiing et al., 2009). The content of γ -oryzanol in breads from pre-GBR and GBR was lower than that found in their respective flours (11 and 14 mg/100 g d.m., respectively) (unpublished data). These results indicate that baking led to noticeable γ -oryzanol losses, likely due to thermal degradation and hydrolysis during dough fermentation by feruloyl esterase from *Saccharomyces cerevisiae* which releases ferulic acid (Coghe, Benoot, Delvaux, Vanderhaegen, & Delvaux, 2004). γ -Oryzanol is also hydrolysed upon gastrointestinal digestion into free sterol and ferulic acid by cholesterol esterases (Mandak & Nyström, 2012). Therefore, the reported biological activity of γ -oryzanol is likely due to free ferulic acid released during digestion. Few clinical studies has been performed so far to support the beneficial effect of ferulic acid in humans, however, results from these studies confirmed the potentially important role of ferulic acid in free radical-induced diseases (Alzheimer's disease, cancer, cardiovascular diseases, diabetes mellitus and skin disease) observed in preclinical research (Mancuso & Santangelo, 2014).

Regarding GABA content, breads from pre-GBR were similar to control bread (Fig. 2A). Germination markedly improved GABA content in bread, this effect being significantly greater with extended germination time ($P \leq 0.05$). Breads from 48 h GBR showed 6 times higher GABA content than control bread ($P \leq 0.05$). These results agree with a previous study reporting a time-dependent GABA accumulation during germination of BR (Caceres et al., 2014; Charoenthaikij, Jangchud, Jangchud, Prinyawiwatkul, & Tungtrakul, 2010). GABA accumulation is initiated in the soaking process (Caceres et al., 2014; Charoenthaikij et al., 2010) and continues during germination due to the increased activity of glutamate decarboxylase that catalyses the decarboxylation of L-glutamic via GABA shunt pathway (Scott-Taggart, Van Cauwenbergh, McLean, & Shelp, 1999). The GABA concentration of pre-GBR and GBR breads was lower than that observed by our group in pre-germinated (28 °C for 24 h) and germinated (28 °C for 48 h) flours from Ecuadorian BR cultivars (8.0–16.7 mg/100 g d.m. and 70.8–83.1 mg/100 g d.m., respectively) (Caceres et al., 2014). This observation indicates that GABA decreases during BR bread making which is consistent with previous studies (Watanabe, Maeda, Tsukahara, Kayahara, & Morita, 2004). GABA losses during bread making are attributed to its consumption during yeast fermentation or amino acid degradation during Maillard browning reactions, as reported by Lamberts et al. (2012). Human intervention studies have shown that a daily intake of 10–20 mg of GABA is able to prevent pre-hypertension (Inoue et al., 2003). Therefore, a daily consumption of 100 g of bread from GBR for 48 h containing 37.5 mg of GABA would provide enough GABA to display the health benefits observed in previous studies (Inoue et al., 2003).

Total phenolic content was higher in breads from pre-GBR and GBR than control bread ($P \leq 0.05$) (Fig. 2A). Similarly to GABA, TPC was noticeably improved in GBR breads with germination time ($P \leq 0.05$). Breads from GBR for 48 h showed 1.5 times higher total phenolic contents than the control bread ($P \leq 0.05$). These results agree with previous studies on grain germinations (Caceres et al., 2014; Moongngarm & Saetung, 2010) and are directly related to the induction of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway and in the degradation of the cell wall polysaccharides and proteins that cause the release of bound phenolics (He, Han, Yao, Shen, & Yang, 2011). This is supported by Tian, Nakamura, and Kayahara (2004) who showed a significant increase in free ferulic, *p*-coumaric and sinapic acids and as well as insoluble but hydrolyzable phenolic compounds, together with decreases in the hydroxycinnamate sucrose esters in GBR.

The antioxidant activity of bread (583 μ g TE/100 g d.m.) was reduced when BR was submitted to the steeping process

($P \leq 0.05$) (Fig. 2B). BR germination for 12 h slightly increased the ORAC values of pre-GBR bread, although antioxidant activity was not improved when compared to the control bread. Interestingly, increased antioxidant activity was observed in bread compared with control when BR was germinated for longer times (24 and 48 h). These results could be ascribed to the biosynthesis of compounds with antioxidant activity to maintain a balance of the redox homeostasis during germination and to the hydrolysis of bound phenolics due to polysaccharide cell-wall degradation (He et al., 2011). TPC and γ -oryzanol content were positively correlated with ORAC ($r^2 = 0.8614$ and 0.7627 , respectively) which supports this hypothesis. Besides radical-scavenging activity, several studies have demonstrated that phenolic compounds and γ -oryzanol may also display their antioxidant effects acting as hydrogen and electron donors and through indirect antioxidant mechanisms, such as up-regulation of antioxidant genes and down-regulation of oxidative stress gene markers (Ismail, Al-Naqeeb, Mamat, & Ahmad, 2010). The use of 48 h GBR as a raw material for bread making is recommended as it provides higher antioxidant activity for a better protection against oxidative stress, which is linked with the development of several chronic diseases.

4. Conclusions

This study shows that germination of BR is a natural way of improving the nutritional quality of gluten-free rice breads. Brown-rice germination for 48 h provides bread with nutritionally superior quality on the basis of its higher content of protein, lipids and bioactive compounds (GABA and polyphenols), increased antioxidant activity and reduced phytic acid content and glycaemic index.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of Spanish Scientific Research Council (CSIC), the Spanish Ministry of Economy and Sustainability (Project AGL 2010-16310 and AGL2011-23802) and the Generalitat Valenciana (Project Prometeo 2012/064). F. Cornejo and P. Caceres acknowledge the financial support of National Secretary of High Education, Science, Technology and Innovation (SENESCYT, Ecuador). National Autonomous Institute of Agricultural Research from Ecuador (INIAP) is thanked for providing the BR cultivars.

References

- Albarracín, M., González, R. J., & Drago, S. R. (2013). Effect of soaking process on nutrient bio-accessibility and phytic acid content of brown rice cultivar. *LWT – Food Science and Technology*, 53(1), 76–80.
- Butterworth, P. J., Warren, F. J., Grassby, T., Patel, H., & Ellis, P. R. (2012). Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2189–2197.
- Caceres, P. J., Martinez-Villaluenga, C., Amigo, L., & Frias, J. (2014). Maximizing the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*, 152, 407–414.
- Charoenthaikij, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Prinyawiwatkul, W., & Tungtrakul, P. (2010). Germination conditions affect selected quality of composite wheat-germinated brown rice flour and bread formulations. *Journal of Food Science*, 75(6), 312–318.
- Charoenthaikij, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Prinyawiwatkul, W., & No, H. (2012). Composite wheat-germinated brown rice flours: Selected physicochemical properties and bread application. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1), 75–82.
- Chung, H. J., Cho, D. W., Park, J. D., Kweon, D. K., & Lim, S. T. (2012). *In vitro* starch digestibility and pasting properties of germinated brown rice after hydrothermal treatments. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 451–456.
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., & Delvaux, F. R. (2004). Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 602–608.

- Cornejo, F., & Rosell C.M. (2014). Influence of germination time of brown rice in relation to flour features and gluten free bread quality. *Journal of Food Quality* (Submitted).
- de la Hera, E., Rosell, C. M., & Gomez, M. (2014). Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility. *Food Chemistry*, 151, 526–531.
- Dura, A., Blaszczyk, W., & Rosell, C. M. (2014). Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydrate Polymers*, 101, 837–845.
- FAO Food and Nutrition, Paper 77. (2003). *Food energy – methods of analysis and 429 conversion factors*, Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
- Frei, M., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Studies on the *in vitro* starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. *Food Chemistry*, 83(3), 395–402.
- Goni, I., Garcia Alonso, A., & Saura Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17, 427–437.
- Granfeldt, Y., Björck, I., Drews, A., & Tovar, J. (1992). An *in vitro* procedure based on chewing to predict metabolic responses to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, 649–660.
- He, D., Han, C., Yao, J., Shen, S., & Yang, P. (2011). Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics*, 11, 2693–2713.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for 455 estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42, 1269–1273.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., et al. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490–495.
- Ismail, M., Al-Naqeeb, G., Mamat, W. A. A. B., & Ahmad, Z. (2010). Gamma-oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant and oxidative stress related genes in stressed rat's liver. *Nutrition and Metabolism*, 7 (Art. No. 23).
- Ito, S., & Ishikawa, Y. (2004). Marketing of value-added rice products in Japan: germinated brown rice and rice bread. *FAO Rice Conference 04/CRS.7*. <<http://www.hatsuga.com/DOHER/english/en/GBRRB.html>>.
- Kiing, S.-C., Yiu, P.-H., Rajan, A., & Wong, S.-C. (2009). Effect of germination on γ -oryzanol content of selected sarawak rice cultivars. *American Journal of Applied Sciences*, 6(9), 1658–1661.
- Kim, S. P., Kang, M. Y., Nam, S. H., & Friedman, M. (2012). Dietary rice component γ -oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 935–944.
- Lamberts, L., Joye, I. J., Beliën, T., & Delcour, J. A. (2012). Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chemistry*, 130(4), 896–901.
- Lee, S. H., Park, H. J., Jung, H. J., Cho, S. M., Cho, Y. S., & Lilleho, H. S. (2005). Effects of dietary phytic acid on serum and hepatic lipid levels in diabetic KK mice. *Nutrition Research*, 25, 869–876.
- Mancuso, C., & Santangelo, R. (2014). Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 185–195.
- Mandak, E., & Nyström, L. (2012). The effect of *in vitro* digestion on steryl ferulates from rice (*Oryza sativa* L.) and other grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6123–6130.
- Marco, C., & Rosell, C. M. (2008). Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1205–1213.
- Matos, E., & Rosell, C. M. (2011). Chemical composition and starch digestibility of different gluten-free breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(3), 224–230.
- Moongngarm, A., & Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122, 782–788.
- Moongngarm, A., & Khomphiphatkul, E. (2011). Germination time dependence of bioactive compounds and antioxidant activity in germinated rough rice (*Oryza sativa* L.). *American Journal of Applied Sciences*, 8, 15–25.
- Oatway, L., Vasanthan, T., & Helm, J. H. (2001). Phytic acid. *Food Reviews International*, 17, 419–431.
- Oh, C., & Oh, S. (2004). Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 19–23.
- Reichwald, K., & Hatzack, F. (2008). Application of a modified Haug and Lantzsch method for rapid and accurate photometrical phytate determination in soybean, wheat, and maize meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2888–2891.
- Sancho, A. I., Faulds, C. B., Bartolomé, B., & Williamson, G. (1999). Characterisation of feruloyl esterase activity in barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 447–449.
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 330–375.
- Scott-Taggart, C. P., Van Cauwenberghe, O. R., McLean, M. D., & Shelp, B. J. (1999). Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis *in situ* by glutamate availability. *Physiologia Plantarum*, 106, 363–369.
- Tian, S., Nakamura, K., & Kayahara, H. (2004). Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4808–4813.
- Veluppillai, S., Nithyanantharajah, K., Vasantharuba, S., Balakumar, S., & Arasaratnam, V. (2009). Biochemical changes associated with germinating rice grains and germination improvement. *Rice Science*, 16, 240–242.
- Watanabe, M., Maeda, T., Tsukahara, K., Kayahara, H., & Morita, N. (2004). Application of pre-germinated brown rice for breadmaking. *Cereal Chemistry*, 81(4), 450–455.
- Xu, J., Zhang, H., Guo, X., & Qian, H. (2012). The impact of germination on the characteristics of brown rice flour and starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 380–387.
- Zheng, Y. M., Li, Q., & Ping, H. (2007). Effects of germination on protein and amino acid composition in brown rice. *Journal of Chinese Cereals Oils Association*, 22, 7–11.

DISCUSSION GENERAL

5. Discusión general

Más de la mitad de la población mundial cubre sus necesidades energéticas a partir de la ingesta de arroz blanco, el cual se obtiene con un alto grado de pulido que reduce considerablemente su valor nutricional (Wrigley, 2010). Estas dietas basadas en arroz blanco, debido a la eliminación del salvado y al alto contenido de carbohidratos fácilmente disponibles, se asocian a enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico como la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Zhang y col., 2010; Song y col., 2014).

El consumo de cereales integrales, que mantienen el salvado aún en su estructura, proporciona numerosas ventajas para la salud, que ha contribuido a una creciente popularidad del arroz integral como fuente importante de nutrientes, de fibra y de compuestos bioactivos. Además, el uso de procesos biotecnológicos, como la germinación, permiten potenciar su valor nutricional y beneficios sobre la salud del consumidor (Chang y col., 2014).

En la germinación se activan procesos metabólicos complejos que conducen a profundos cambios en composición del arroz integral. De este modo, el arroz integral germinado se transforma en un producto con mayor valor nutritivo y con mayor bioactividad (Jiamyangyuen, 2008), que puede ser destinado al consumo directo o a procesos de deshidratación y molturación para la obtención de harina. Este tipo de harina de alto valor nutritivo y sin gluten puede utilizarse como ingrediente en la suplementación de alimentos o en el desarrollo de nuevos productos. Estas nuevas formas de consumir arroz permitirán no sólo aprovechar los posibles excedentes de producción sino que, además, contribuirán a combatir enfermedades asociadas a dietas poco saludables (Patil y Khan, 2011).

Durante los últimos años, la producción de arroz en Ecuador se ha incrementado notablemente e, incluso, se ha llegado a exportar cantidades importantes a países vecinos. Se espera que en los siguientes años la producción ecuatoriana se duplique, por lo que el excedente de arroz ofrecerá la oportunidad de reemplazar a otras fuentes de almidón, como por ejemplo el trigo. Además, el arroz no contiene gluten, por lo que se

considera una de las alternativas prometedoras para elaborar alimentos destinados a la población de celíacos.

En esta discusión integradora presentamos los resultados obtenidos en las publicaciones I y II y en el registro de patente, en las que se evalúa el efecto de las distintas condiciones de germinación sobre los cambios en la composición nutritiva y la acumulación de compuestos bioactivos en las distintas variedades y cultivares del arroz integral. A continuación, se discuten los resultados de la publicación III, en la que se abordó el efecto del tiempo de germinación en el valor nutritivo y funcional de un pan elaborado a base de harina de arroz integral germinado.

5.1. Efecto de las condiciones de germinación en el valor nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de distintas variedades de arroz integral.

Durante el proceso de germinación se restauran las actividades metabólicas de la semilla y, en consecuencia, los procesos bioquímicos iniciados canalizan la hidrólisis de macronutrientes y la síntesis y acumulación de nuevos compuestos (Chen y col., 2015). En este trabajo, el estudio sistemático de distintas condiciones, como el tiempo y la temperatura de germinación, en distintas variedades, ha permitido ampliar el conocimiento de la influencia de cada variable sobre el valor nutricional del arroz integral. Estudios previos sobre el cambio fisiológico y composicional que ejerce el proceso de germinación sobre el arroz integral se han dedicado al empleo específico de una única variedad y condiciones muy concretas de temperatura y tiempo de germinación (Mohd. Esa y col., 2013; Zhang y col., 2014), por lo que nuestras aportaciones contribuyen a obtener un avance en el conocimiento sobre los cambios producidos durante este proceso.

Debido a que la temperatura de germinación influye sobre el metabolismo de la semilla, se seleccionaron parámetros (28 y 34 °C) que se encuentran dentro del rango de valores que han sido anteriormente estudiados sobre germinación de arroz (Chungcharoen y col.; Cruz y Milach, 2004) y que además, están dentro del intervalo de la temperatura ambiente del litoral ecuatoriano, considerando que la obtención de

germinados de arroz integral sea económicamente viable. El tiempo de germinación se prolongó durante 4 días para aprovechar la máxima actividad enzimática que desarrolla el grano de arroz (Saman y col., 2008; Mohan y col., 2010). Prolongar más el tiempo de germinación conduce a la obtención de germinados avanzados que desarrollan tallos muy largos y leñosos, aumentan los azúcares reductores, se produce el crecimiento de microorganismos y se originan aromas que van en detrimento de la calidad sensorial (Veluppillai y col., 2009).

Con el objetivo de asegurar una comparación efectiva entre los distintos ensayos, se determinó inicialmente el porcentaje de germinación de cada variedad de arroz integral tanto a 28 °C como a 34 °C, durante 2 y 4 días. Los porcentajes de germinación fueron superiores al 92% en todas la variedades sin presentar, además, diferencia entre las condiciones del proceso. Esto permitió confirmar que las condiciones de germinación establecidas para el estudio permiten obtener altos rendimientos de germinación del arroz integral.

Dada la importancia del genotipo en el valor nutritivo del arroz integral y del efecto de las diferentes condiciones de germinación, se decidió evaluar el contenido proteico, lipídico, cenizas, carbohidratos disponibles, fibra alimentaria y ácido fítico en seis variedades ecuatorianas antes y después de ser sometidas a remojo (pre-germinación) y posterior germinación a 28 o 34 °C durante 2 o 4 días. La germinación está asociada a la mejora de la digestibilidad de proteínas, por tanto, se estudió el efecto de la germinación en distintas condiciones en el grado de hidrólisis y en el contenido de péptidos de los arroces integrales germinados.

La composición proximal de las muestras de arroz integral sin germinar nos permitió conocer el aporte nutritivo de cada variedad. Todas las variedades destacaron por su alto contenido proteico, observándose algunas diferencias que pueden ser debidas al genotipo y a diferentes condiciones edafoclimáticas durante su cultivo (Heinemann y col., 2005; Sar y col., 2014). Las distintas variedades de arroz se pudieron clasificar según su contenido proteico en variedades con contenido alto (INIAP14), intermedio (Go39839, INIAP15, INIAP17 y SLF09) y bajo (F50). Las variedades INDIA-PRONACA (SLF09 y F50) presentaron mayor contenido lipídico y menor cantidad de carbohidratos, mientras que no se encontraron diferencias en el contenido de minerales entre las

variedades estudiadas. La composición nutricional de todas las variedades de arroz integral ecuatorianas está dentro del rango descrito en la bibliografía por otros investigadores (Heinemann y col., 2005; Megat Rusydi, 2011; Arendt y Zannini, 2013).

Es importante destacar que durante la pre-germinación a la que fueron sometidas las semillas, se observaron cambios leves en la composición proximal del grano de arroz integral. Por ejemplo, el contenido proteico solo varió en el cultivar Go39839, descendiendo ligeramente con respecto al arroz crudo. La cantidad de carbohidratos en este cultivar aumentó ligeramente, mientras que disminuyó levemente en las variedades INIAP15 y SLF09. En cuanto al contenido lipídico, en el cultivar Go39839 y en las variedades INIAP17 y F50 se produjo un ligero descenso, mientras que en las variedades INIAP15 y SLF09, el contenido lipídico sufrió un ligero aumento. Como consecuencia de la pre-germinación, el contenido de minerales disminuyó en cinco de las variedades estudiadas, excepto en la variedad SLF09 cuyo contenido en minerales no varió. Los ligeros cambios obtenidos en la composición proximal como consecuencia de la pre-germinación pueden ser debidos a la solubilización de dichos compuestos en el agua de remojo y posterior lixiviación, así como al consiguiente cambio porcentual de cada uno de ellos en el peso total de las semillas pre-germinadas (Liang y col., 2008; Albarracín y col., 2013).

Por lo que respecta al proceso de germinación propiamente dicho, observamos que las variables estudiadas (temperatura y tiempo), afectaron de forma distinta al contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales. Mediante el empleo de análisis de correlación componente-variable se determinó el efecto que las condiciones de germinación ejercen sobre cada constituyente del arroz integral germinado.

Respecto al contenido proteico, la germinación a distintas condiciones no provocó cambios relevantes en la mayoría de las variedades de arroz integral, siendo la variedad F50 la que sufrió el mayor aumento respecto de su arroz integral sin tratamiento, concretamente a 28 °C durante 4 días. El cultivar Go39839 y la variedad INIAP14, presentaron una correlación negativa con el tiempo de germinación y positiva con la temperatura, mientras que en la variedad INIAP17 se observó que era sólo el tiempo de germinación la variable que más afecta a su proteína, disminuyendo su contenido a medida que transcurre el tiempo. El distinto efecto de las condiciones de germinación

sobre el contenido de proteína podría explicarse a que este proceso promueve la síntesis de nuevos compuestos nitrogenados como, por ejemplo, ácidos nucleicos, hormonas y enzimas, al mismo tiempo que se incrementa la actividad de las proteasas hidrolizando las proteínas a péptidos y aminoácidos libres más fácilmente solubles que, a su vez, podrían ser eliminados por lixiviación durante el riego de los brotes (Veluppillai y col., 2009; Megat Rusydi, 2011; Albarracín y col., 2013).

Durante la germinación, el contenido de carbohidratos disminuyó en todas las variedades estudiadas y se encontró una correlación negativa con el tiempo y la temperatura de germinación. El arroz integral germinado de las variedades INDIA-PRONACA (SLF09 y F50) fueron las que presentaron el mayor descenso en carbohidratos. Las diferencias encontradas en la concentración de carbohidratos en cada variedad germinada pueden estar relacionadas con la cantidad de amilosa presente en cada una de ellas y su hidrólisis como consecuencia de la actividad amilásica, que puede verse ligeramente afectada por la temperatura de germinación. En consecuencia, se incrementan los azúcares sencillos que son, posteriormente, utilizados como recursos nutritivos para el crecimiento del brote (Veluppillai y col., 2009). Además, la cinética de hidrólisis de carbohidratos puede ser distinta para cada variedad debido a la presencia de complejos lípido-almidón en el grano de arroz (Arendt y Zannini, 2013).

El contenido lipídico varió con la germinación dependiendo tanto de la variedad estudiada como de las condiciones utilizadas. La temperatura de germinación se correlacionó positivamente con el contenido en lípidos en todas las variedades, excepto la variedad INIAP15, mientras que el tiempo de germinación se correlacionó positivamente con el contenido en lípidos en las variedades INIAP15, INIAP17, F50 y Go39839. Las variedades de arroz integral germinado INDIA-PRONACA destacaron por su mayor contenido lipídico. El comportamiento diferente de este nutriente en cada variedad durante la germinación puede ser debido no solo por la síntesis de nuevos ácidos grasos insaturados (Megat Rusydi, 2011), sino por la acción de las lipasas endógenas, cuyo objetivo es hidrolizar las grasas y obtener la energía necesaria para la protrusión de la plántula, que puede estar afectada por la presencia de complejos lípido-almidón en el grano de arroz (He y Yang, 2013).

La germinación ocasionó un descenso en el contenido en minerales en todas las variedades de arroz. Dentro de los germinados obtenidos, las variedades INDIA-PRONACA presentaron mayor contenido que las variedades INIAP y el cultivar Go39839. Diferentes investigaciones han puesto de manifiesto que el contenido de cenizas y la biodisponibilidad de los minerales aumenta con la germinación (Liang y col., 2008; Moongngarm y Saetung, 2010). Sin embargo, en nuestro caso se observó un descenso progresivo del contenido de minerales, resultados coincidentes con los presentados por Rusydi (Megat Rusydi, 2011), que explicaron que este efecto podría deberse a su lixiviación durante el remojo previo y posterior germinación (Liang y col., 2008).

En general, los valores obtenidos sobre la composición proximal durante la germinación de arroz integral evidenciaron que en este proceso no solo influye el tiempo y la temperatura, sino también la variedad de arroz germinada.

Una vez conocido el efecto de las diferentes condiciones de germinación en la composición proximal de las diferentes variedades de arroz integral germinado, nos propusimos conocer su efecto sobre otros componentes como son la fibra alimentaria, el ácido fítico y el contenido de péptidos.

Con respecto a la fibra alimentaria, las diferentes variedades de arroz integral estudiadas evidenciaron un contenido importante y, en nuestro caso, presentaron mayor contenido en fibra soluble que fibra insoluble. Estos resultados contrastan con los ofrecidos por otros autores que indican que la fracción de fibra soluble es menor que la insoluble en la semilla cruda (Savitha y Singh, 2011), aunque los valores parecen depender de la variedad y del tiempo de cosecha (Lin y Lai, 2011). La pre-germinación del arroz integral incrementó ligeramente el contenido de fibra soluble e insoluble, en todos los casos, aunque fue después de la germinación cuando su aumento se hizo más notable. Hay que destacar que las variedades INDIA-PRONACA inicialmente contienen un valor superior de fibra alimentaria que las otras variedades estudiadas, hecho que se mantuvo hasta el cuarto día de germinación. En general, la correlación de esta variable con la temperatura y el tiempo de germinación fue positiva en todas las variedades. Se ha mostrado en distintos trabajos que la germinación incrementa el contenido de fibra alimentaria (Ohtsubo y col., 2005) y que tiene un impacto sobre sus diferentes fracciones,

dependiendo su proporción en la semilla y de las condiciones de germinación (Martín-Cabrejas y col., 2008; Megat Rusydi, 2011).

El contenido de ácido fítico fue similar en todas las muestras de arroz integral sin germinar y concuerda con los valores que ofrecen otras investigaciones (Liang y col., 2008). La pre-germinación ocasionó un descenso del contenido en todas las variedades estudiadas, excepto en la variedad SLF09. Durante la germinación, el contenido de ácido fítico sufrió una reducción muy acusada, siendo las variedades INIAP las que llegaron a alcanzar los niveles más bajos. Además, encontramos que tanto el tiempo como la temperatura de germinación se correlacionaron negativamente con el contenido de ácido fítico, con excepción de la variedad SLF09, en la que sólo el tiempo tuvo un impacto negativo, mientras que la temperatura no mostró ningún efecto. En general, tanto las variedades INIAP como INDIA-PRONACA, presentaron las mayores reducciones de ácido fítico a los 4 días de germinación a 34 °C. La reducción del ácido fítico total se relaciona no solo con pérdidas por lixiviación en el remojo y riego de los brotes, sino también con la actividad de las fitasas endógenas responsables de la liberación del fósforo y de la molécula de inositol hexafosfato IP_6 , dando lugar a inositoles fosfato menos fosforilados (IP_5 , IP_4 , IP_3) (Kumar y col., 2010; Albarracín y col., 2013). Nuestros resultados muestran concordancia con otras publicaciones, donde la pre-germinación y la germinación resultan efectivas para disminuir el ácido fítico del arroz (Moongngarm y Saetung, 2010; Kim y col., 2012; Albarracín y col., 2013)

La reducción del ácido fítico lleva consigo notables connotaciones nutricionales, ya que aumenta la biodisponibilidad de minerales esenciales, así como también la digestibilidad de las proteínas y del almidón, como se ha puesto de manifiesto en otras semillas germinadas (Honke y col., 1998; Liang y col., 2008; Wu y col., 2012).

Durante la germinación del arroz integral sucede la hidrólisis proteica y, como consecuencia, aumenta su digestibilidad. El grado de hidrólisis fue insignificante durante la pre-germinación del arroz integral, efecto observado también por otros investigadores que han manifestado una baja actividad proteolítica en fases tempranas de la germinación (Veluppillai y col., 2009). En cambio, a mayor tiempo y mayor temperatura de germinación se incrementó considerablemente la hidrólisis proteica, dependiendo además, de la variedad. El mayor grado de hidrólisis tuvo lugar en la variedad F50,

concretamente a 34 °C después de 4 días. Durante la germinación, la proteólisis ocurre por la activación y síntesis de proteasas con la consiguiente liberación y acumulación de péptidos y aminoácidos libres (Veluppillai y col., 2009) lo que mejora la digestibilidad de la proteína del arroz integral, y por tanto, su valor nutritivo (Moongngarm y Saetung, 2010).

Dado el alto grado de hidrólisis observado durante la germinación en todas las variedades estudiadas se determinó su contenido en péptidos. En todas las variedades estudiadas la germinación aumentó el contenido de péptidos, encontrándose el mayor incremento en la variedad SLF09. Este resultado fue atribuido a su alto contenido de proteína inicial y a un aceptable grado de hidrólisis que tiene lugar durante la germinación. Como se ha descrito en otros alimentos, los péptidos liberados pueden tener beneficios importantes en la salud (Limón y col., 2014), sin embargo, aún no se ha encontrado información sobre las secuencias de aminoácidos que se liberan durante la germinación del arroz integral. Hasta el momento, tan sólo se han identificado péptidos antioxidantes derivados de proteínas de arroz tras la aplicación de procesos de hidrólisis enzimática y fermentación (Dei Piu y col., 2014; Yan y col., 2015), siendo la germinación una posible estrategia natural para la obtención de péptidos bioactivos.

Estos resultados han contribuido a mejorar el conocimiento sobre el efecto de la interacción del tiempo y la temperatura de germinación en los cambios composicionales y nutricionales de distintas variedades ecuatorianas de arroz integral. Hemos observado que la germinación mejora el valor nutricional del arroz integral y su consumo puede contribuir a una alimentación saludable (Fardet, 2010).

Como se mencionó anteriormente, la temperatura y el tiempo de germinación tienen un profundo efecto sobre los nutrientes del arroz integral. Sin embargo, durante este proceso no solo se modifican los constituyentes mayoritarios, sino que también pueden verse afectados otros compuestos que se encuentran en menor cantidad como los fitoquímicos, que desde el punto de vista fisiológico tienen efecto sobre la salud.

Un segundo objetivo fue estudiar el efecto de las diferentes condiciones de germinación sobre el contenido de GABA, compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante en las variedades INIAP y en el cultivar Go39839, y mediante la aplicación

de modelos de superficie de respuesta, obtener las condiciones óptimas del proceso que asegurasen el máximo contenido de cada uno de ellos.

Durante la pre-germinación del arroz integral, el contenido de GABA se incrementó considerablemente en todas las variedades estudiadas y este aumento se hizo más acusado durante el proceso de germinación. Estos resultados están en concordancia con otros estudios que señalan un claro efecto positivo de la germinación sobre la acumulación de GABA en diferentes cereales (Chungcharoen y col.; Donkor y col., 2012; Chen y col., 2015). Este hecho puede ser debido a la activación de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) durante la pre-germinación de la semilla y a su sobreexpresión durante la germinación. La GAD cataliza la síntesis de GABA a partir de la descarboxilación del ácido L- glutámico (Diana y col., 2014). Por otro lado, nuestros resultados indicaron, por primera vez, que la temperatura y la variedad de arroz afectaban a la tasa de acumulación de GABA. La acumulación de este compuesto se ralentizó cuando la temperatura de germinación aumentó de 28 °C a 34 °C en las variedades INIAP15 e INIAP17, mientras que este efecto no se observó en Go39839 e INIAP14. En general, temperaturas de germinación más altas (34 °C) dieron lugar a una mayor concentración de GABA en los germinados, lo que es coherente con estudios que demuestran que la actividad de la GAD en el arroz aumenta con la temperatura (Yang y col., 2013). Además, se ha descrito que en condiciones de estrés abiótico el GABA puede sintetizarse durante la germinación a partir de la putrescina por la enzima diamino oxidasa (Shelp y col., 2012). Cabe destacar que la variedad de arroz integral INIAP15 fue la que presentó la mayor acumulación de este compuesto.

Con respecto al contenido total de compuestos fenólicos libres, las variedades INIAP y Go39839 de arroz integral presentaron un contenido superior al observado en variedades asiáticas de arroz no pigmentado (Huang y Ng, 2012), lo que pone de manifiesto su interés para el desarrollo de alimentos saludables. En cuanto a los compuestos fenólicos totales, se observó que durante la pre-germinación del arroz integral su contenido se incrementó en todas las variedades estudiadas y continuó su acumulación durante el proceso de germinación, resultados que están de acuerdo con lo descrito en estudios anteriores (Moongngarm y Saetung, 2010). El incremento de los compuestos fenólicos totales durante la germinación del arroz integral parece estar

relacionado con la activación y expresión del sistema enzimático de la ruta de los fenilpropanoides responsable de su síntesis y acumulación y a la hidrólisis y solubilización de los compuestos fenólicos ligados a polisacáridos de la pared celular por la activación y expresión de enzimas con actividad esterasa (Tian y col., 2004; He y col., 2011). Tanto el tiempo como la temperatura de germinación influyeron notablemente sobre el contenido de los compuestos fenólicos y observamos que su mayor acumulación se consiguió al cuarto día a 28 °C. Aunque el incremento se dio en todas las variedades estudiadas, la variedad de arroz integral INIAP15 fue la que presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos. Estos resultados podrían deberse al incremento de la actividad de enzimas responsable de la oxidación de compuestos fenólicos, tales como las polifenoloxidasas y peroxidasas, tal y como se ha observado durante la germinación del trigo en estudios anteriores (Gupta y col., 2013). Adicionalmente, encontramos que la temperatura de germinación afecta el contenido de polifenoles totales de forma diferente en cada variedad, resultados que no han sido reportados anteriormente.

Es importante mencionar que las cantidades máximas obtenidas en este estudio, tanto de GABA como de compuestos fenólicos totales, son mayores que las descritas por otros investigadores en arroz integral germinado (Sen, 2008; Moongngarm y Saetung, 2010). La diferencia entre los valores obtenidos en nuestro trabajo con los estudios previos se puede deber no sólo al empleo de otras condiciones de germinación, sino también al uso de otras variedades de arroz, las cuales tienen inicialmente cantidad y composición fenólica diferente (Shao y Bao, 2015), así como también a variaciones tanto en el contenido inicial de GABA (Karladee y Suriyong, 2012; Zhang y col., 2014) como en la actividad de la GAD (Jannoey, 2010; Khwanchai y col., 2014).

Con respecto a la actividad antioxidante, las cuatro variedades de arroz integral estudiadas presentaban inicialmente valores importantes, principalmente debido a que el grano cuenta con el germen y las capas externas ricas en fitoquímicos con esta propiedad (Zhou y col., 2014). El proceso de pre-germinación incrementó ligeramente la actividad antioxidante sólo en la variedad INIAP14. En cambio, la germinación aumentó considerablemente en todas las variedades de arroz integral, observándose que el tiempo y la temperatura de germinación afectan positivamente a la actividad antioxidante del germinado de arroz integral. La mayor actividad antioxidante fue observada a 34 °C

después de 4 días de germinación, siendo el cultivar Go39839 el que presentó mayor incremento. El aumento de la actividad antioxidante podría atribuirse a la acumulación de compuestos fenólicos durante la germinación (Tian y col., 2004), que fue corroborado con una correlación positiva entre el contenido en compuestos fenólicos y la actividad antioxidante. Así mismo, otros autores han correlacionado positivamente la actividad antioxidante con el contenido de ácido ferúlico (Zhou y col., 2014). Es interesante destacar que la temperatura a la que se obtiene la mayor actividad antioxidante es a 34 °C y, en cambio, a 28°C se observó la mayor acumulación de compuestos fenólicos totales, lo que sugiere la presencia de otros compuestos antioxidantes que contribuyen al mantenimiento del equilibrio redox como el γ -orizanol, tocoferoles y tocotrienoles (He y col., 2011). Las diferencias cuantitativas de nuestros resultados de actividad antioxidante con los señalados por otras investigaciones recientes pueden deberse al empleo de diferentes variedades y condiciones de germinación (Ti y col., 2014).

La aplicación de condiciones de estrés durante la germinación puede potenciar la acumulación de compuestos bioactivos en el arroz integral germinado. Por ejemplo, la aplicación de luz continua desde la germinación ha resultado eficaz en la acumulación de compuestos fenólicos (de Almeida y col., 2013). Por tanto, nuestro siguiente objetivo se centró en investigar el efecto de la aplicación de luz continua desde la fase de remojo de la semilla en el contenido de γ -orizanol y GABA en el arroz integral germinado. La novedad de nuestro descubrimiento consistió en demostrar que a través de la germinación del arroz integral en presencia de luz continua en un rango de temperaturas de 25 a 35 °C por un periodo de hasta 120 h aumenta, no sólo el contenido de GABA, sino también de γ -orizanol, obteniéndose valores muy superiores al de los germinados en las mismas condiciones de temperatura y tiempo en oscuridad. Hasta el momento, no existen estudios previos publicados ni otras patentes protegidas que declaren las condiciones específicas que conduzcan a un incremento tan notable de la cantidad de GABA y γ -orizanol.

Nuestro hallazgo se fundamenta en que la pre-germinación y la germinación, además de aumentar el metabolismo del arroz integral, la presencia de la luz generaría un estrés abiótico aumentando los niveles de ésteres del ácido ferúlico como respuesta antioxidante, coincidiendo con los indicios descritos en la bibliografía que señalan que el

incremento de γ -orizanol en la semilla se debería a los estímulos medioambientales (Butsat y Siriamornpun, 2010) y a la necesidad de ésteres de ácido ferúlico en la estructura de la nueva planta (Hoson y Wakabayashi, 2015). Investigaciones posteriores a nuestra solicitud de patente confirman nuestro descubrimiento, señalando que la formación de cis-ferulatos a partir de trans-ferulatos, estos últimos inestables, se da como respuesta a la exposición a la luz natural o luz ultravioleta (Wang y col., 2015).

Cabe destacar que los valores de GABA durante la germinación empleando luz, fueron superiores a los que presentamos en la segunda publicación. Hasta el momento no se ha reportado alguna investigación al respecto, por lo que nuestra patente presenta una clara innovación del proceso para obtener un grano de arroz integral con alto valor funcional promoviendo no sólo el consumo como tal, sino su aplicación como materia prima para la obtención de nutraceuticos o ingredientes bioactivos.

En conjunto, las mejoras del valor nutricional y el aumento de los fitoquímicos, indica claramente el alto valor funcional del arroz integral germinado, ofreciendo la oportunidad de desarrollar nuevos productos que contribuyan a fortalecer el binomio dieta-salud.

5.2 Utilización de arroz integral germinado en la elaboración de panes para personas con necesidades nutricionales especiales.

Debido al aumento mundial de personas que sufren enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, así como el aumento de la población de pacientes celíacos, ha tomado auge la investigación para desarrollar nuevos productos alimenticios que, además de estar libres de gluten, ofrezcan un claro beneficio para la salud. La celiaquía está asociada a la fracción de la gliadina del gluten presente en el trigo y otros cereales, lo que ha conducido a la búsqueda de estrategias para reemplazar esta proteína. Para el caso del pan, un producto de alto consumo donde la materia prima básica es harina de trigo, se han presentado varias alternativas a base de harina de maíz, quinua, amaranto e, incluso, arroz (Rosell y col., 2014).

Aunque la obtención de un pan libre de gluten a base de arroz ha sido abordado por otros investigadores (Renzetti y Arendt, 2009; Phimolsiripol y col., 2012), la utilización de arroz integral germinado es totalmente novedoso e innovador. El empleo de harina de arroz integral germinado para desarrollar un producto de panificación apto para celíacos, además de estar libre de epítomos presentes en la fracción de la gliadina, mejoraría su valor nutricional y funcional por ser una fuente importante de nutrientes, péptidos, fibra alimentaria y fitoquímicos como GABA, γ -orizanol y compuestos fenólicos. La discusión de esta parte del trabajo se enfoca en el efecto del tiempo de germinación del arroz integral en las propiedades nutricionales y el valor funcional que ofrece un pan libre de gluten, formulado con harina de arroz integral germinado de la variedad INIAP15 durante 12, 24 y 48 h a 28 °C, y se comparó con un pan control elaborado con arroz integral sin germinar.

En cuanto a las propiedades nutricionales del pan de arroz integral germinado, se observó que el proceso de pre-germinación no influyó en su composición proximal, salvo en el contenido de minerales que sufrió una reducción con respecto del pan control. Estos resultados podrían ser atribuidos al menor contenido de minerales presente en la harina por efecto de la lixiviación durante el proceso de remojo de las semillas (Liang y col., 2008). Por el contrario, los panes elaborados con arroz integral germinado presentaron un mayor contenido de proteína y menor de carbohidratos, independientemente del tiempo de germinación. En cuanto a los minerales, se observó un descenso progresivo en los panes con el tiempo de germinación, encontrándose los valores más bajos a las 48 h. El contenido en grasa del pan disminuyó progresivamente con el tiempo de germinación hasta las 24 h, tiempo a partir del cual aumentó significativamente. Además, se observó un aumento progresivo de glucosa libre en el pan con el tiempo de germinación. Durante la germinación aumenta la actividad amilásica, responsable de la degradación del almidón y aumento de dextrinas y azúcares reductores (Tomasik y Horton, 2012; Wu y col., 2013), lo cual explica nuestros resultados. En general, la composición proximal de estos panes de arroz integral germinado están en concordancia con los valores reportados para panes comerciales libres de gluten (Matos Segura y Rosell, 2011).

Con respecto al ácido fítico, los panes elaborados con harina de arroz integral pre-germinado y germinado presentaron un menor contenido que el pan de arroz integral sin

germinar. Comparando los panes obtenidos con harinas de arroz integral germinado a distintos tiempos se observó que el contenido de ácido fítico fue significativamente superior en el pan elaborado con arroz germinado durante 24 h. La reducción del ácido fítico se encuentra en concordancia con los valores de los germinados de nuestra primera publicación, siendo importante destacar que la diferencia entre las cantidades de la harina y del pan se debe al empleo de otras materias primas en la formulación y a la hidrólisis adicional del ácido fítico por las fitasas de las levaduras durante el proceso de fermentación en la elaboración del pan (Bilgiçli y col., 2006; Liang y col., 2008).

Se ha demostrado que el ácido fítico tiene la capacidad de quelar minerales (hierro, zinc, magnesio, calcio, entre otros) disminuyendo su biodisponibilidad, así como también la absorción de aminoácidos, proteínas y almidón (Oatway y col., 2001), por lo que su reducción es interesante para mejorar la calidad nutricional del pan (Dyner Luis, 2007). Por otra parte cabe señalar que existen evidencias científicas que apuntan a un efecto beneficioso del ácido fítico sobre la salud humana. Diversos estudios han demostrado que el ácido fítico posee actividad hipocolesterolémica en ratones diabéticos (Lee y col., 2005), anticancerígena (Norazalina y col., 2010) y antioxidante (Fardet, 2010), lo que ha sugerido evitar la eliminación total de este compuesto de la dieta (Albarracín y col., 2013).

La digestibilidad proteica encontrada en los panes elaborados con arroz integral pre-germinado no presentó diferencias con el pan control. Sin embargo, tiempos de germinación cortos (12h) mejoraron ligeramente la digestibilidad proteica. Contrariamente a lo esperado, la digestibilidad proteica de los panes elaborados con arroz integral germinado durante 24 y 48 h fue inferior. Estas observaciones podrían atribuirse a la participación de la lisina en la reacción de pardeamiento no enzimático durante el horneado (Wang y col., 2011; Martinez-Alvarenga y col., 2014), sobre todo en harinas de arroz integral germinado durante 24 y 48 h, donde el contenido de azúcares reductores fue mayor (Chung y col., 2012). Adicionalmente, durante la cocción del pan se podrían producir entrecruzamientos entre los aminoácidos formando estructuras más rígidas y reducirse, de ese modo, la digestibilidad de la proteína (Lassé y col., 2015).

En los panes de arroz integral, la mayor digestibilidad del almidón se observó en aquellos elaborados con arroz integral sin germinar y desciende conforme aumenta el tiempo de germinación, destacando el pan elaborado con arroz integral germinado

durante 48 h, que presentó la menor digestibilidad del almidón. Esto puede deberse, a que durante la germinación se produce una hidrólisis inicial, reduciéndose la cantidad de almidón a digerir y, como consecuencia, se producen oligosacáridos que ya no son degradados por las α -amilasas (Palmer, 2007). Además, el remojo y posterior secado puede incrementar la resistencia de los gránulos de almidón a la digestión, debido a la formación de estructuras más cristalinas de difícil acceso a las enzimas hidrolíticas (Xu y col., 2012; Dura y col., 2014). Adicionalmente, el tratamiento con calor húmedo durante la cocción del pan lleva a la formación de almidón resistente debido a los cambios estructurales amilosa-amilopectina que aumentan la rigidez de los gránulos de almidón y otros polisacáridos y, en consecuencia, su resistencia a la digestión enzimática (Chung y col., 2012).

Los panes de arroz integral germinado presentaron una reducción considerable del índice glicémico en relación al pan control, siendo el pan elaborado con harina de arroz integral germinado durante 48 h el que presentó el menor índice glicémico. Debido a que el control de la glucemia juega un papel importante sobre la salud, su reducción en los panes de arroz integral germinado se considera muy positivo, ayudando en la prevención de enfermedades de riesgo cardiometabólico, tales como la obesidad, la diabetes y la hiperlipidemia (Imam y Ismail, 2013). De hecho, los valores que obtuvimos en este trabajo son inferiores a los que se pueden encontrar en panes libres de gluten (de la Hera y col., 2014) e, incluso, en panes elaborados con arroz (Matos Segura y Rosell, 2011). La reducción que encontramos en el índice glicémico de los panes de arroz integral germinado puede deberse a los cambios estructurales del almidón anteriormente mencionados, así como su acomplejamiento con los lípidos que puede aumentar su resistencia a la hidrólisis enzimática (Xu y col., 2012; Arendt y Zannini, 2013).

El análisis del efecto de la pre-germinación y del tiempo de germinación del arroz integral sobre el contenido de compuesto bioactivos y de la actividad antioxidante en el pan, nos permitió identificar el potencial funcional de este nuevo alimento como una alternativa de consumo saludable. Con respecto al γ -orizanol, observamos que tanto la pre-germinación como la germinación del arroz integral dan lugar a un descenso del contenido de su contenido en el pan. No obstante, se observó una influencia significativa del tiempo de germinación en el contenido de este compuesto en el pan. Tiempos de

germinación más largos (24 y 48 h) dieron lugar a mayores niveles de γ -orizanol en el pan en comparación con la pre-germinación y la germinación durante 12 h. Este descenso en el contenido de γ -orizanol en el pan elaborado con harinas de arroz integral, podría deberse al aumento de la actividad de la feruloil esterasa durante la germinación. Las feruloilesterasas hidrolizan esteres de ácidos fenólicos dando como resultado la liberación del ácido ferúlico (Sancho y col., 1999; Kiing y col., 2009) cuyo papel es conformar, junto con la lignina, la estructura de la nueva planta (Hatfield y col., 1999) y proveer de mecanismos de defensa frente a agentes medioambientales (Butsat y Siriamornpun, 2010; Lemus y col., 2014). Por otra parte, aunque sólo se ha observado la producción de esterasa intracelular en *Saccharomyces cerevisiae* (Panda y Gowrishankar, 2008), hay indicios que sugieren que durante el proceso de fermentación la levadura produce feruloil esterasa (Coghe y col., 2004), liberando el ácido ferúlico a partir de sus ésteres y, por lo tanto, sea una causa adicional de la variación del contenido de γ -orizanol en nuestros panes.

Cabe mencionar que, aunque otras investigaciones indican que el proceso de cocción no afecta al contenido de γ -orizanol (Pascual y col., 2013), el menor valor obtenido en el pan control respecto a lo que se indica para harina de arroz integral sin germinar (Roohinejad y col., 2010) sugiere que la disminución de este fitocompuesto no sólo se podría asociar a la dilución de los componentes durante la preparación de la masa, sino probablemente también, al efecto del calor húmedo en el horneado (Pramote Khuwijitjaru, 2004), efecto que debe ser estudiado con mayor profundidad.

Se ha indicado que el γ -orizanol ejerce propiedades hipolipídicas, anticancerígenas, antiinflamatorias y antidiabéticas, por lo que los panes de arroz integral germinado podrían formar parte de las dietas para el control y prevención de estos desórdenes. En humanos, se ha demostrado que la ingesta de 300 mg diarios durante 4-8 semanas, reduce los trastornos de la menopausia y, los niveles de lípidos en sangre (colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos), a la vez que eleva el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (Lemus y col., 2014).

Aunque en nuestros estudios no hemos abordado el contenido de tocoferoles, tocotrienoles y de ácido ascórbico, estudios encontrados en la bibliografía indican que se

incrementan con la germinación de arroz integral (Wu y col., 2012), por lo que complementan las propiedades antioxidantes que tiene el γ -orizanol. La presencia de estos antioxidantes en el pan puede suponer una ventaja durante su conservación ya que permite aumentar su vida útil sin la adición de antioxidantes sintéticos (Sunil y col., 2014).

El contenido de GABA en los panes elaborados con arroz integral pre-germinado no se diferenció del pan control. La acumulación de GABA en el pan de harina de arroz integral germinado fue gradual con el tiempo de germinación, que son coherentes con los presentados previamente en nuestra segunda publicación y con otros investigadores que demuestran que con la germinación se obtienen harinas de arroz con un alto contenido de GABA (Su y col., 2008; Charoenthaikij y col., 2010) (Olsen y Li, 2012; Diana y col., 2014). Sin embargo, el contenido de GABA en el pan es inferior al de la harina, efecto que puede explicarse por la utilización de este compuesto por parte de la levadura durante la fermentación y por la participación de este aminoácido en la reacción de Maillard que tiene lugar durante el horneado (Lamberts y col., 2012). Entre los efectos positivos del GABA sobre la salud, destaca su actividad antihipertensiva y la inhibición de la excitabilidad neuronal. La ingesta de dosis de 10 a 20 mg de GABA al día han resultado eficaces para reducir la tensión arterial en individuos con pre-hipertensión (Inoue y col., 2003) y una dosis de 26,4 mg de GABA parece ser efectiva en el tratamiento de trastornos neurológicos (Diana y col., 2014). Teniendo en cuenta estos estudios, el consumo de 100 g de pan elaborado con arroz integral germinado 48 h proveería 37,5 mg de GABA y podría ser contribuir en el control de la presión arterial y en el tratamiento de desórdenes mentales.

Respecto al contenido de polifenoles totales, estos compuestos aumentaron ligeramente en el pan a base de arroz integral pre-germinado y alcanzaron su máximo contenido en el pan elaborado con harina de arroz integral germinado durante 48 h. Estos valores, aunque guardan relación con los resultados del arroz integral germinado, son superiores a lo observado en las harinas correspondientes, lo que podría deberse a la actividad metabólica de las levaduras y a la liberación de compuestos fenólicos ligados a polisacáridos de la pared celular durante la fermentación de la masa (Đorđević y col., 2010; Alves y Perrone, 2015). Además, se ha demostrado que el proceso de horneado también influye en el aumento de compuestos fenólicos, sugiriendo mecanismos como la

despolimerización de compuestos fenólicos de alto peso molecular y la formación de compuestos de Maillard (Abdel-Aal y Rabalski, 2013).

Como parte importante del valor funcional de los panes elaborados con arroz integral germinado se evaluó su actividad antioxidante. Los panes elaborados con arroz integral pre-germinado y germinado durante 12 h presentaron un valor inferior de actividad antioxidante que el pan control. Panes elaborados con harinas de arroz integral de mayor tiempo de germinación incrementaron su actividad antioxidante, encontrándose el valor máximo en el pan elaborado con harina de arroz integral germinado durante 48 h. Estos resultados son coherentes con la actividad antioxidante observada en el arroz integral germinado. Sin embargo, el pan presentó valores superiores, sugiriendo que el proceso de fermentación de la masa y su posterior horneado conduce a un incremento de compuestos con propiedades antioxidantes (Abdel-Aal y Rabalski, 2013), como por ejemplo la presencia de complejos de fenoles con las melanoidinas (Alves y Perrone, 2015). Es importante resaltar que, aunque el arroz integral germinado posee varios compuestos con actividad antioxidante (Zhou y col., 2014), se obtuvo una correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos totales y de γ -orizanol presentes en el pan elaborado con arroz integral germinado, indicando la contribución de este fitoquímico en la actividad antioxidante de los panes estudiados.

Por lo tanto, con los resultados obtenidos en esta tercera publicación, se sugiere la utilización de harina de arroz integral germinado durante 48 h en la elaboración de pan libre de gluten ya que, además de poseer un bajo índice glicémico y baja digestibilidad de los carbohidratos, el aporte de GABA, γ -orizanol, compuestos fenólicos y actividad antioxidante permite obtener un alimento de alto valor funcional. Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las publicaciones I y II, el incremento del contenido de fibra alimentaria y de péptidos durante la germinación potencia el carácter funcional del pan elaborado con arroz integral germinado.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. El impacto de las diferentes condiciones de germinación sobre la composición proximal y el valor nutricional dependen de cada variedad estudiada de arroz integral. El contenido proteico no sufrió cambios relevantes, los carbohidratos disminuyeron en todas la variedades estudiadas, las variedades INDIA-PRONACA presentaron el mayor contenido lipídico y los minerales descendieron con la germinación.
2. El contenido en fibra alimentaria aumentó en todas las variedades de arroz integral durante la germinación.
3. El ácido fítico desciende con la germinación y las mayores reducciones se consiguieron a los 4 días a 34°C en las variedades INIAP.
4. A mayor temperatura y tiempo de germinación se produce mayor incremento de la hidrólisis proteica y, en consecuencia, una mayor acumulación de péptidos que dependió, además, de la variedad.
5. Los cambios en el contenido de GABA y de compuestos fenólicos, por efecto de la pre-germinación del arroz integral, fueron sustanciales en todas las variedades, no así la actividad antioxidante, que solo incrementa en la variedad INIAP14.
6. El máximo contenido de GABA y de actividad antioxidante se obtiene a 34 °C, mientras que los compuestos fenólicos se maximizan a 28 °C, en todos los casos durante 4 días de germinación. La variedad INIAP15 fue la que presentó la mayor acumulación de GABA y compuestos fenólicos, mientras que el cultivar Go39839 presentó la mayor actividad antioxidante.
7. La germinación del arroz integral en presencia de luz continua en un rango de temperaturas de 25 a 35 °C por un periodo de 4 días aumenta tanto el contenido de GABA como de γ -orizanol, obteniéndose valores muy superiores al de los germinados en las misma condiciones en oscuridad.

8. Los cambios en la composición proximal del pan elaborado con arroz integral germinado fue independiente a las condiciones de germinación.
9. Panes elaborados con harina de arroz integral germinado durante 48 h presentaron una calidad nutricional superior por su mayor contenido de proteínas, lípidos, GABA, compuestos polifenoles totales y actividad antioxidante, así como un menor índice glucémico y de γ -orizanol, comparado con el pan de arroz integral no germinado.
10. La digestibilidad proteica y del almidón, junto con el índice glicémico y el contenido de ácido fítico del pan elaborado con arroz integral germinado disminuyeron al incrementar el tiempo de germinación.
11. Este estudio demuestra que la germinación es una alternativa natural, económica y sostenible para mejorar la calidad del arroz integral y las harinas obtenidas después de 48 h pueden ser utilizadas en la elaboración de un pan nutritivo y funcional libre de gluten.

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografía

- AACC, A. A. f. C. C. (2001). "The definition of dietary fiber." *Cereal Foods World* 46: 112.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Rabalski, I. (2013). "Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products." *Journal of Cereal Science* 57(3): 312-318.
- Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). "Antioxidant activity of grains." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 6182-6187.
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Prasad, S., Kannappan, R. (2010). "Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases." *Biochemical Pharmacology* 80(11): 1613-1631.
- Albarracín, M., González, R. J., Drago, S. R. (2013). "Effect of soaking process on nutrient bio-accessibility and phytic acid content of brown rice cultivar." *LWT - Food Science and Technology* 53(1): 76-80.
- Alonço, A. d. S. (2005). "Consumo, Mercado e Comercialização do Arroz no Brasil, Embrapa, Brasil." Retrieved 22 Noviembre, 2014, from <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/index.htm>.
- Alves, G., Perrone, D. (2015). "Breads enriched with guava flour as a tool for studying the incorporation of phenolic compounds in bread melanoidins." *Food Chemistry* 185(0): 65-74.
- Aoe, S., Oda, T., Tojima, T., Tanaka, M., Tatsumi, K., Mizutani, T. (1993). "Effects of rice bran hemicellulose on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in Fischer 344 rats." *Nutrition and Cancer* 20(1): 41-49.
- Arendt, E. K., Zannini, E. (2013). 3 - Rice. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. E. K. Arendt and E. Zannini, Woodhead Publishing: 114-154.
- Ayernor, G. S., Ocloo, F. C. K. (2007). "Physico-chemical changes and diastatic activity associated with germinating paddy rice (PSB.Rc 34)." *Afr. J. Food Sci.* 1: 37-41.
- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D. A. (2014). "Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(8): 1881-1889.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M. (2014). Chapter 8 - Variation in Seed Dormancy and Germination within and between Individuals and Populations of a Species. *Seeds (Second Edition)*. C. C. Baskin and J. M. Baskin. San Diego, Academic Press: 277-373.
- Belobrajdic, D. P., Bird, A. R. (2013). "The potential role of phytochemicals in wholegrain cereals for the prevention of type-2 diabetes." *Nutrition Journal* 12(1).
- Bhatnagar, A. S., Prabhakar, D. S., Prasanth Kumar, P. K., Raja Rajan, R. G., Gopala Krishna, A. G. (2014). "Processing of commercial rice bran for the production of fat and nutraceutical rich rice brokens, rice germ and pure bran." *LWT - Food Science and Technology* 58(1): 306-311.
- Bilgiçli, N., Elgün, A., Türker, S. (2006). "Effects of various phytase sources on phytic acid content, mineral extractability and protein digestibility of tarhana." *Food Chemistry* 98(2): 329-337.

- Butsat, S., Siriamornpun, S. (2010). "Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice." *Food Chemistry* 119(2): 606-613.
- Butterfield, D. A., Pocernich, C. (2003). "The Glutamatergic System and Alzheimer's Disease." *CNS Drugs* 17(9): 641-652.
- CEI-RD, C. d. E. e. I. d. I. R. D. (2011). "Perfil Económico Arroz." Retrieved 24 Noviembre, 2014, from http://www.cei-rd.gov.do/ceird/estudios_economicos/estudios_productos/perfiles/arroz.pdf.
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., Delvaux, F. R. (2004). "Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(3): 602-608.
- Cornejo, F., Rosell, C. M. (2015). "Influence of germination time of brown rice in relation to flour and gluten free bread quality." *Journal of Food Science and Technology*.
- Cruz, R. P. d., Milach, S. C. K. (2004). "Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes." *Scientia Agricola* 61: 1-8.
- Cui, S. W., Roberts, K. T. (2009). CHAPTER 13 - Dietary Fiber: Fulfilling the Promise of Added-Value Formulations. *Modern Biopolymer Science*. S. K. T. N. B. Ubbink. San Diego, Academic Press: 399-448.
- Champagne, E. T., Wood, D. F., Juliano, B., O., Bechtel, D. B. (2004). CHAPTER 4: THE RICE GRAIN AND ITS GROSS COMPOSITION. *RICE: Chemistry and Technology*, American Association of Cereal Chemists, Inc.: 77-107.
- Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2011). "Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17): 9563-9571.
- Chang, U. J., Hong, Y. H., Jung, E. Y., Suh, H. J. (2014). Chapter 27 - Rice and the Glycemic Index. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. R. R. W. R. P. Zibadi. San Diego, Academic Press: 357-363.
- Charoenthaikij, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Piyachomkwan, K., Tungtrakul, P., Prinyawiwatkul, W. (2009). "Germination conditions affect physicochemical properties of germinated brown rice flour." *Journal of Food Science* 74(9): C658-C665.
- Charoenthaikij, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Prinyawiwatkul, W., No, H. K. (2012). "Composite wheat-germinated brown rice flours: Selected physicochemical properties and bread application." *International Journal of Food Science and Technology* 47(1): 75-82.
- Charoenthaikij, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Prinyawiwatkul, W., Tungtrakul, P. (2010). "Germination Conditions Affect Selected Quality of Composite Wheat-Germinated Brown Rice Flour and Bread Formulations." *Journal of Food Science* 75(6): S312-S318.
- Chen, H. H., Chang, H. C., Chen, Y. K., Hung, C. L., Lin, S. Y., Chen, Y. S. (2015). "An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma." *Food Chemistry*(0).
- Chen, Y. J., Chen, Y. Y., Wu, C. T., Yu, C. C., Liao, H. F. (2010). "Prolamin, a rice protein, augments anti-leukaemia immune response." *Journal of Cereal Science* 51(2): 189-197.

- Cho, J.-Y., Lee, H. J., Kim, G. A., Kim, G. D., Lee, Y. S., Shin, S. C., Park, K.-H., Moon, J.-H. (2012). "Quantitative analyses of individual γ -Oryzanol (Steryl Ferulates) in conventional and organic brown rice (*Oryza sativa* L.)." *Journal of Cereal Science* 55(3): 337-343.
- Choque, B., Catheline, D., Rioux, V., Legrand, P. (2014). "Linoleic acid: Between doubts and certainties." *Biochimie* 96(0): 14-21.
- Chung, H.-J., Cho, A., Lim, S.-T. (2012). "Effect of heat-moisture treatment for utilization of germinated brown rice in wheat noodle." *LWT - Food Science and Technology* 47(2): 342-347.
- Chung, H.-J., Cho, A., Lim, S.-T. (2014). "Utilization of germinated and heat-moisture treated brown rices in sugar-snap cookies." *LWT - Food Science and Technology* 57(1): 260-266.
- Chung, H.-J., Cho, D.-W., Park, J.-D., Kweon, D.-K., Lim, S.-T. (2012). "In vitro starch digestibility and pasting properties of germinated brown rice after hydrothermal treatments." *Journal of Cereal Science* 56(2): 451-456.
- Chung, H. S., Shin, J. C. (2007). "Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo)." *Food Chemistry* 104(4): 1670-1677.
- Chungcharoen, T., Prachayawarakorn, S., Tungtrakul, P., Soponronnarit, S. "Effects of germination time and drying temperature on drying characteristics and quality of germinated paddy." *Food and Bioproducts Processing*(0).
- Datta, S. K., Khush, G. S. (2002). "Improving rice to meet food and nutritional needs: Biotechnological approaches." *Journal of Crop Production* 6(1-2): 229-247.
- de Almeida, S. L., Schmidt, É. C., Pereira, D. T., Kreusch, M., de L. Felix, M. R., Osorio, L. K. P., de Paula Martins, R., Latini, A., Ramlov, F., Chow, F., Maraschin, M., Rodrigues, A. C., Bouzon, Z. L. (2013). "Effect of ultraviolet-B radiation in laboratory on morphological and ultrastructural characteristics and physiological parameters of selected cultivar of *Oryza sativa* L." *Protoplasma* 250(6): 1303-1313.
- de la Hera, E., Rosell, C. M., Gomez, M. (2014). "Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility." *Food Chemistry* 151(0): 526-531.
- Dei Piu, L., Tassoni, A., Serrazanetti, D. I., Ferri, M., Babini, E., Tagliazucchi, D., Gianotti, A. (2014). "Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins." *Food Chemistry* 155(0): 199-206.
- Dendy, D. A. V., Dobraszczyk, B. J. (2004). *Cereales y Productos Derivados Química y Tecnología*, Acribia.
- Diana, M., Quílez, J., Rafecas, M. (2014). "Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review." *Journal of Functional Foods* 10(0): 407-420.
- Ding, J., Zhou, Q., Yang, T., Dong, M., Zhang, L., Xiong, S. (2015). "Effects of low temperature and low oxygen storage on γ -aminobutyric acid content of brown rice during germination." *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association* 30(1): 1-7 and 19.

Dipti, S. S., Bergman, C., Indrasari, S. D., Herath, T., Hall, R., Lee, H., Habibi, F., Bassinello, P. Z., Graterol, E., Ferraz, J. P., Fitzgerald, M. (2012). "The potential of rice to offer solutions for malnutrition and chronic diseases." *Rice* 5(1).

Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., Vasiljevic, T. (2012). "Germinated grains – Sources of bioactive compounds." *Food Chemistry* 135(3): 950-959.

Đorđević, T. M., Šiler-Marinković, S. S., Dimitrijević-Branković, S. I. (2010). "Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals." *Food Chemistry* 119(3): 957-963.

Dura, A., Błaszczak, W., Rosell, C. M. (2014). "Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments." *Carbohydrate Polymers* 101(0): 837-845.

Dyner Luis, D. S., Piñero Adriana, Sanchez Hugo, González Rolando, Villamil Edda, Valencia Mirta, (2007). "Composición y aporte potencial de hierro, calcio y zinc de panes y fideos elaborados con harinas de trigo y amaranto." *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(1): 69-77.

El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A., El-Beltagy, A. E. (2003). "Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds." *Plant Foods for Human Nutrition* 58(3): 1-13.

El País. (2008). "El silicio secreto del arroz." Retrieved May 5, 2015, from.

(http://elpais.com/diario/2008/02/27/futuro/1204066803_850215.html).

Emperatriz Pacheco, Domínguez, J. P. y. A. O. (2002). "COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ACEITE Y SALVADO DE ARROZ ESTABILIZADO POR CALOR." *Agronomía Tropical* 52(2): 173-185.

Escudero, A. E., González, S. P. (2006). "La fibra dietética." *Nutrición Hospitalaria* 21(2): 61-72.

Eun, H. J., Sung, R. K., In, K. H., Tae, Y. H. (2007). "Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(24): 9800-9804.

Fan, G.-J., Jin, X.-L., Qian, Y.-P., Wang, Q., Yang, R.-T., Dai, F., Tang, J.-J., Shang, Y.-J., Cheng, L.-X., Yang, J., Zhou, B. (2009). "Hydroxycinnamic Acids as DNA-Cleaving Agents in the Presence of Cull Ions: Mechanism, Structure–Activity Relationship, and Biological Implications." *Chemistry – A European Journal* 15(46): 12889-12899.

FAO, O. d. I. N. U. p. I. A. y. I. A. (2014). "Mapa del Hambre 2014 de la FAO." Retrieved 20 January, 2015, from <http://www.fao.org/hunger/es/>.

FAOSTAT, O. d. I. N. U. p. I. A. y. I. A. (2014). "Producción mundial de arroz en cáscara." Retrieved May 15, 2015, from <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Fardet, A. (2010). "New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?" *Nutrition Research Reviews* 23(01): 65-134.

Fernández, R. (2006). Optimización de procesos biotecnológicos para la obtención de harinas funcionales de leguminosas con elevado contenido en compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante, *Universidad Autónoma de Madrid*.

Frei, M., Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). "Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines." *Food Chemistry* 83(3): 395-402.

Goffman, F. D., Bergman, C. J. (2004). "Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(10): 1235-1240.

Gollapudi, S., Ghoneum, M. (2008). "MGN-3/Biobran, modified arabinoxylan from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin." *Cancer Detection and Prevention* 32(1): 1-6.

Gupta, N. K., Agarwal, S., Agarwal, V. P., Nathawat, N. S., Gupta, S., Singh, G. (2013). "Effect of short-term heat stress on growth, physiology and antioxidative defence system in wheat seedlings." *Acta Physiologiae Plantarum* 35(6): 1837-1842.

Hager, A. S., Wolter, A., Jacob, F., Zannini, E., Arendt, E. K. (2012). "Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours." *Journal of Cereal Science* 56(2): 239-247.

Hatfield, R. D., Ralph, J., Grabber, J. H. (1999). "Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3): 403-407.

He, D., Han, C., Yao, J., Shen, S., Yang, P. (2011). "Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach." *PROTEOMICS* 11(13): 2693-2713.

He, D., Yang, P. (2013) "Proteomics of rice seed germination." *Frontiers in plant science* 4, 246 DOI: 10.3389/fpls.2013.00246.

Heinemann, R. J. B., Fagundes, P. L., Pinto, E. A., Penteado, M. V. C., Lanfer-Marquez, U. M. (2005). "Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil." *Journal of Food Composition and Analysis* 18(4): 287-296.

Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., Górecki, R. (1998). "Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds." *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 206(4): 279-283.

Hoson, T., Wakabayashi, K. (2015). "Role of the plant cell wall in gravity resistance." *Phytochemistry* 112(0): 84-90.

Huang, S. H., Ng, L. T. (2012). "Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan." *Journal of Food Composition and Analysis* 26(1-2): 122-127.

Imam, M. U., Azmi, N. H., Bhanger, M. I., Ismail, N., Ismail, M. (2012). "Antidiabetic Properties of Germinated Brown Rice: A Systematic Review." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 12.

Imam, M. U., Ishaka, A., Ooi, D.-J., Zamri, N. D. M., Sarega, N., Ismail, M., Esa, N. M. (2014). "Germinated brown rice regulates hepatic cholesterol metabolism and cardiovascular disease risk in hypercholesterolaemic rats." *Journal of Functional Foods* 8(0): 193-203.

Imam, M. U., Ismail, M. (2013). "Nutrigenomic effects of germinated brown rice and its bioactives on hepatic gluconeogenic genes in type 2 diabetic rats and HEPG2 cells." *Molecular Nutrition & Food Research* 57(3): 401-411.

INDIA-PRONACA. (2014). "Semillas." Retrieved 23 Noviembre, 2014, from <http://www.pronaca.com/site/principalAgricola.jsp?arb=1099&cdgPad=26&cdgCat=7&cdgSub=8&cdgPr=735>.

INEC, I. N. d. E. y. C. (2013). "Estadísticas Agropecuarias." Retrieved 22 Noviembre 2014, from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

INEC, I. N. d. E. y. C. (2014). "Cadena Agroalimentaria, Análisis del Sistema Agroalimentario del Arroz en el Ecuador." Retrieved 22 Noviembre 2014, 2014 from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/cadenas-agroalimentarias/>.

Infoarroz. (2014). "El portal de arroz en América Latina, Estadísticas." Retrieved 22 Noviembre 2014, from <http://www.infoarroz.org/portal/es/content.php?section=12>.

INIAP, I. N. d. I. A. (2014). "Variedades liberadas por el INIAP." Retrieved 23 Noviembre, 2014, from http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=346&Itemid=249.

Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H. (2003). "Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing [gamma]-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives." *Eur J Clin Nutr* 57(3): 490-495.

IRRI, I. R. R. I. (2015). Retrieved May 19, 2015, from <http://irri.org/our-work/research/genetic-diversity>.

Ito, Y., Mizukuchi, A., Kise, M., Aoto, H., Yamamoto, S., Yoshihara, R., Yokoyama, J. (2005). "Postprandial blood glucose and insulin responses to pre-germinated brown rice in healthy subjects." *Journal of Medical Investigation* 52(3-4): 159-164.

Ito, Y. I. S. (2004). Marketing of value-added Rice Products in Japan: Germinated Brown Rice and Rice Bread. *Proceedings of the FAO Rice Conference Rice in Global Markets* - O. d. I. N. U. p. I. A. y. I. A. FAO. Rome, 12-13 Febrero, FAO.

Jannoey, P. (2010). "γ-Aminobutyric Acid (GABA) Accumulations in Rice During Germination." *Chiang Mai J. Sci.* 37(1): 124-133.

Jiamyangyuen, B. O. S. (2008). "The physico-chemical, eating and sensorial properties of germinated brown rice." *Journal of Food, Agriculture & Environment* 6(2): 1 1 9 - 1 2 4.

Juliano, B. O. (1994). El arroz en la nutrición humana.

Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Komiyama, Y., Yagi, M., Andoh, A., Sata, M. (2010). "Preventive effects of enzyme-treated rice fiber in a restraint stress-induced irritable bowel syndrome model." *International Journal of Molecular Medicine* 25(4): 547-555.

- Kanaya, Y., Doi, T., Sasaki, H., Fujita, A., Matsuno, S., Okamoto, K., Nakano, Y., Tsujiwaki, S., Furuta, H., Nishi, M., Tsuno, T., Taniguchi, H., Nanjo, K. (2004). "Rice bran extract prevents the elevation of plasma peroxylipid in KKAY diabetic mice." *Diabetes Research and Clinical Practice* 66(SUPPL.): S157-S160.
- Kang, K. A., Lee, J. H., Zhang, R., Piao, M. J., Chung, H. S., Hyun, J. W. (2010). "Oryzadine, a new alkaloid of *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyee, attenuates oxidative stress-induced cell damage via a radical scavenging effect." *Food Chemistry* 119(3): 1135-1142.
- Karladee, D., Suriyong, S. (2012). "γ-Aminobutyric acid (GABA) content in different varieties of brown rice during germination." *ScienceAsia* 38(1): 13-17.
- Kaukovirta-Norja, A., Wilhelmson, A., Poutanen, K. (2004). "Germination: A means to improve the functionality of oat." *Agricultural and Food Science* 13(1-2): 100-112.
- Kayahara, H. K. T. (2000). Flavor, Health and Nutritional Quality of Pre-germinated Brown Rice. *presented at 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies in Hawaii*.
- Khush, G. S. (1997). "Origin, dispersal, cultivation and variation of rice." *Plant Molecular Biology* 35(1-2): 25-34.
- Khwanchai, P., Chinprahast, N., Pichyangkura, R., Chaiwanichsiri, S. (2014). "Gamma-aminobutyric acid and glutamic acid contents, and the GAD activity in germinated brown rice (*Oryza sativa* L.): Effect of rice cultivars." *Food Science and Biotechnology* 23(2): 373-379.
- Kiing, S. C., Yiu, P. H., Rajan, A., Wong, S. C. (2009). "Effect of germination on γ-oryzanol content of selected sarawak rice cultivars." *American Journal of Applied Sciences* 6(9): 1658-1661.
- Kim, H. Y., Hwang, I. G., Kim, T. M., Woo, K. S., Park, D. S., Kim, J. H., Kim, D. J., Lee, J., Lee, Y. R., Jeong, H. S. (2012). "Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination." *Food Chemistry* 134(1): 288-293.
- Kim, M. Y., Lee, S. H., Jang, G. Y., Park, H. J., Li, M., Kim, S., Lee, Y. R., Noh, Y. H., Lee, J., Jeong, H. S. (2015). "Effects of high hydrostatic pressure treatment on the enhancement of functional components of germinated rough rice (*Oryza sativa* L.)." *Food Chemistry* 166: 86-92.
- Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N., Kimura, T. (2007). "Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice." *Journal of Food Engineering* 78(2): 556-560.
- Kong, C. K. L., Lam, W. S., Chiu, L. C. M., Ooi, V. E. C., Sun, S. S. M., Wong, Y. S. (2009). "A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis." *Biochemical Pharmacology* 77(9): 1487-1496.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., Etherton, T. D. (2002). "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer." *The American Journal of Medicine* 113(9, Supplement 2): 71-88.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2010). "Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review." *Food Chemistry* 120(4): 945-959.

- Lamberts, L., Joye, I. J., Beliën, T., Delcour, J. A. (2012). "Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making." *Food Chemistry* 130(4): 896-901.
- Lassé, M., Deb-Choudhury, S., Haines, S., Larsen, N., Gerrard, J. A., Dyer, J. M. (2015). "The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein." *Journal of Food Composition and Analysis* 38(0): 42-48.
- Lee, S.-H., Park, H.-J., Cho, S.-Y., Jung, H.-J., Cho, S.-M., Cho, Y.-S., Lillehoj, H. S. (2005). "Effects of dietary phytic acid on serum and hepatic lipid levels in diabetic KK mice." *Nutrition Research* 25(9): 869-876.
- Lemus, C., Angelis, A., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L. (2014). Chapter 32 - γ -Oryzanol: An Attractive Bioactive Component from Rice Bran. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. R. R. Watson, V. R. Preedy and S. Zibadi. San Diego, Academic Press: 409-430.
- Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E. F., Mendonça, C. R. B., Ramis-Ramos, G. (2009). "Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol." *Food Chemistry* 115(2): 389-404.
- Liang, J., Han, B.-Z., Nout, M. J. R., Hamer, R. J. (2008). "Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice." *Food Chemistry* 110(4): 821-828.
- Liang, J., Han, B. Z., Han, L., Nout, M. J. R., Hamer, R. J. (2007). "Iron, zinc and phytic acid content of selected rice varieties from China." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(3): 504-510.
- Limón, R. I., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J. (2014). "Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts." *LWT - Food Science and Technology* 56(2): 328-334.
- Lin, P.-Y., Lai, H.-M. (2011). "Bioactive compounds in rice during grain development." *Food Chemistry* 127(1): 86-93.
- Liu, Q. L., Xu, X. H., Ren, X. L., Fu, H. W., Wu, D. X., Shu, Q. Y. (2007). "Generation and characterization of low phytic acid germplasm in rice (*Oryza sativa* L.)." *Theoretical and Applied Genetics* 114(5): 803-814.
- Maclean, J., Dawe, D., Hardy, B., Hettel, G. (2002). *Rice Almanac*. Los Baños, Laguna: IRRI.
- Mamiya, T., Kise, M., Morikawa, K. (2008). "Ferulic acid attenuated cognitive deficits and increase in carbonyl proteins induced by buthionine-sulfoximine in mice." *Neuroscience Letters* 430(2): 115-118.
- Martín-Cabrejas, M. A., Díaz, M. F., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., Esteban, R. M. (2008). "Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes." *Food Chemistry* 107(3): 1045-1052.
- Martinez-Alvarenga, M. S., Martinez-Rodriguez, E. Y., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Acosta-Muniz, C. H., Sepulveda, D. R. (2014). "Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate – Maltodextrin conjugates." *Food Hydrocolloids* 38(0): 110-118.

- Martínez, M. M., Calviño, A., Rosell, C. M., Gómez, M. (2014). "Effect of Different Extrusion Treatments and Particle Size Distribution on the Physicochemical Properties of Rice Flour." *Food and Bioprocess Technology* 7(9): 2657-2665.
- Matos Segura, M., Rosell, C. (2011). "Chemical Composition and Starch Digestibility of Different Gluten-free Breads." *Plant Foods for Human Nutrition* 66(3): 224-230.
- Megat Rusydi, M. R., Noraliza, C.W., Azrina, A. and Zulkhairi, A. (2011). "Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties." *International Food Research Journal* 18: 705-713.
- Miller, A., Engel, K. H. (2006). "Content of γ -oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(21): 8127-8133.
- Mohan, B. H., Malleshi, N. G., Koseki, T. (2010). "Physico-chemical characteristics and non-starch polysaccharide contents of Indica and Japonica brown rice and their malts." *LWT - Food Science and Technology* 43(5): 784-791.
- Mohd. Esa, N., Abdul Kadir, K.-K., Amom, Z., Azlan, A. (2013). "Antioxidant activity of white rice, brown rice and germinated brown rice (in vivo and in vitro) and the effects on lipid peroxidation and liver enzymes in hyperlipidaemic rabbits." *Food Chemistry* 141(2): 1306-1312.
- Molina, J., Sikora, M., Garud, N., Flowers, J. M., Rubinstein, S., Reynolds, A., Huang, P., Jackson, S., Schaal, B. A., Bustamante, C. D., Boyko, A. R., Purugganan, M. D. (2011). "Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(20): 8351-8356.
- Moongngarm, A. (2013). "Chemical compositions and resistant starch content in starchy foods." *American Journal of Agricultural and Biological Science* 8(2): 107-113.
- Moongngarm, A., Saetung, N. (2010). "Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice." *Food Chemistry* 122(3): 782-788.
- Murata, K., Kamei, T., Toriumi, Y., Kobayashi, Y., Iwata, K., Fukumoto, I., Yoshioka, M. (2007). "Effect of processed rice with brown rice extracts on serum cholesterol level." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34(SUPPL. 1): S87-S89.
- Nayar, N. M. (2014). Chapter 6 - The Origin of Asian Rice. *Origin and Phylogeny of Rices*. N. M. Nayar. San Diego, Academic Press: 169-253.
- Ng, L. T., Huang, S. H., Chen, Y. T., Su, C. H. (2013). "Changes of tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and γ -aminobutyric acid levels in the germinated brown rice of pigmented and nonpigmented cultivars." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(51): 12604-12611.
- Norazalina, S., Norhaizan, M. E., Hairuszah, I., Norashareena, M. S. (2010). "Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats." *Experimental and Toxicologic Pathology* 62(3): 259-268.
- Normand, F. L., Ory, R. L., Mod, R. R. (1987). "Binding of bile acids and trace minerals by soluble hemicelluloses of rice." *Food Technology*(2): 86-90.

Nyström, L., Achrenius, T., Lampi, A. M., Moreau, R. A., Piironen, V. (2006). "A comparison of the antioxidant properties of steryl ferulates with tocopherol at high temperatures." *Food Chemistry* 101(3): 947-954.

Oatway, L., Vasanthan, T., Helm, J. H. (2001). "PHYTIC ACID." *Food Reviews International* 17(4): 419-431.

Oh, C. H., Oh, S. H. (2004). "Effects of Germinated Brown Rice Extracts with Enhanced Levels of GABA on Cancer Cell Proliferation and Apoptosis." *Journal of Medicinal Food* 7(1): 19-23.

Oh, S. H. (2003). "Stimulation of γ -aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/glutamic acid germination solution and calcium/calmodulin." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36(3): 319-325.

Oh, S. K., Hwang, P. S., Kim, K. J., Kim, Y. K., Lee, J. H. (2010). "Changes in nutritional components throughout germination in paddy rice and brown rice." *Journal of Food Science and Nutrition* 15(2): 113-119.

Ohnishi, M., Matuo, T., Tsuno, T., Hosoda, A., Nomura, E., Taniguchi, H., Sasaki, H., Morishita, H. (2004). "Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice." *BioFactors* 21(1-4): 315-319.

Ohtsubo, K. i., Suzuki, K., Yasui, Y., Kasumi, T. (2005). "Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder." *Journal of Food Composition and Analysis* 18(4): 303-316.

Olsen, R. W., Li, G.-D. (2012). Chapter 18 - GABA. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. S. T. B. J. S. W. A. L. Price. New York, Academic Press: 367-376.

Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins.* , John Wiley & Sons, Ltd.

Ou, K., Cheng, Y., Xing, Y., Lin, L., Nout, R., Liang, J. (2011). "Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting." *Journal of Food Science and Technology* 48(5): 598-603.

Palmer, P. L. B. T. (2007). *Enzymes*, Woodhead Publishing.

Panda, T., Gowrishankar, B. S. (2008). "Critical analysis of application of generalized distance function for optimization of important variables for esterase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae*." *Bioresource Technology* 99(13): 5545-5555.

Pascual, C. d. S. C. I., Massaretto, I. L., Kawassaki, F., Barros, R. M. C., Noldin, J. A., Marquez, U. M. L. (2013). "Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.)." *Food Research International* 50(2): 676-681.

Patil, S., Khan, M. K. (2011). "Germinated brown rice as a value added rice product: A review." *Journal of Food Science and Technology* 48(6): 661-667.

Phimolsiripol, Y., Mukprasirt, A., Schoenlechner, R. (2012). "Quality improvement of rice-based gluten-free bread using different dietary fibre fractions of rice bran." *Journal of Cereal Science* 56(2): 389-395.

- Pramote Khuwijitjaru, N. T., Suchaya Changprasit (2004). "Degradation of Gamma-oryzanol in Rice Bran Oil during Heating : An Analysis Using Derivative UV-spectrophotometry." *SILPAKORN UNIVERSITY JOURNAL OF SOCIAL SCIENCES, HUMANITIES, AND ARTS* Vol. 4 (Number 1-2).
- Ren, X. L., Liu, Q. L., Fu, H. W., Wu, D. x., Shu, Q. Y. (2007). "Density alteration of nutrient elements in rice grains of a low phytate mutant." *Food Chemistry* 102(4): 1400-1406.
- Renzetti, S., Arendt, E. K. (2009). "Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure." *Journal of Cereal Science* 50(1): 22-28.
- Roohinejad, S., Omidizadeh, A., Mirhosseini, H., Saari, N., Mustafa, S., Meor Hussin, A. S., Hamid, A., Abd Manap, M. Y. (2011). "Effect of pre-germination time on amino acid profile and gamma amino butyric acid (GABA) contents in different varieties of Malaysian brown rice." *International Journal of Food Properties* 14(6): 1386-1399.
- Roohinejad, S., Omidizadeh, A., Mirhosseini, H., Saari, N., Mustafa, S., Mohd Yusof, R., Meor Hussin, A. S., Hamid, A., Abd Manap, M. Y. (2010). "Effect of pre-germination time of brown rice on serum cholesterol levels of hypercholesterolaemic rats." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(2): 245-251.
- Rosell, C. M., Barro, F., Sousa, C., Mena, M. C. (2014). "Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection." *Journal of Cereal Science* 59(3): 354-364.
- Saman, P., Vázquez, J. A., Pandiella, S. S. (2008). "Controlled germination to enhance the functional properties of rice." *Process Biochemistry* 43(12): 1377-1382.
- Sancho, A. I., Faulds, C. B., Bartolomé, B., Williamson, G. (1999). "Characterisation of feruloyl esterase activity in barley." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3): 447-449.
- Sar, S., Tizzotti, M. J., Hasjim, J., Gilbert, R. G. (2014). "Effects of Rice Variety and Growth Location in Cambodia on Grain Composition and Starch Structure." *Rice Science* 21(1): 47-58.
- Savitha, Y. S., Singh, V. (2011). "Status of dietary fiber contents in pigmented and non-pigmented rice varieties before and after parboiling." *LWT - Food Science and Technology* 44(10): 2180-2184.
- Seki, T., Nagase, R., Torimitsu, M., Yanagi, M., Ito, Y., Kise, M., Mizukuchi, A., Fujimura, N., Hayamizu, K., Ariga, T. (2005). "Insoluble fiber is a major constituent responsible for lowering the post-prandial blood glucose concentration in the pre-germinated brown rice." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28(8): 1539-1541.
- Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. (2006). "Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols." *Life Sciences* 78(18): 2088-2098.
- Sen, Y. (2008). "The variation of γ -aminobutyric acid content in germinated brown rice among different cultivars." *Scientia Agricultura Sinica* 41(12): 3974-3982.
- Shao, Y., Bao, J. (2015). "Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits." *Food Chemistry* 180(0): 86-97.

- Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Trobacher, C. P., Zarei, A., Deyman, K. L., Brikis, C. J. (2012). "Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress." *Plant Science* 193–194(0): 130-135.
- Shih, C., Chu, H., Tang, L., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I., Wang, M., Lo, C. (2008). "Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis." *Planta* 228(6): 1043-1054.
- Shih, F. F. (2003). "An update on the processing of high-protein rice products." *Nahrung - Food* 47(6): 420-424.
- Shu, X., Sun, J., Wu, D. (2014). "Effects of grain development on formation of resistant starch in rice." *Food Chemistry* 164(0): 89-97.
- Shu, X. L., Frank, T., Shu, Q. Y., Engel, K. H. (2008). "Metabolite profiling of germinating rice seeds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(24): 11612-11620.
- Silva, C. R., De Oliveira, J. E. D., De Souza, R. A. H. G., Silva, H. C. (2005). "Effect of a rice bran fiber diet on serum glucose levels of diabetic patients in Brazil." *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 55(1): 23-27.
- Sivaramakrishnan, H. P., Senge, B., Chattopadhyay, P. K. (2004). "Rheological properties of rice dough for making rice bread." *Journal of Food Engineering* 62(1): 37-45.
- Somasundar, P., Riggs, D. R., Jackson, B. J., Cunningham, C., Vona-Davis, L., McFadden, D. W. (2005). "Inositol hexaphosphate (IP6): A novel treatment for pancreatic cancer 1." *Journal of Surgical Research* 126(2): 199-203.
- Song, S., Lee, J. E., Song, W. O., Paik, H.-Y., Song, Y. (2014). "Carbohydrate Intake and Refined-Grain Consumption Are Associated with Metabolic Syndrome in the Korean Adult Population." *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 114(1): 54-62.
- Soriguer, F., Colomo, N., Oliveira, G., García-Fuentes, E., Esteva, I., Ruiz de Adana, M. S., Morcillo, S., Porras, N., Valdés, S., Rojo-Martínez, G. "White rice consumption and risk of type 2 diabetes." *Clinical Nutrition* 32(3): 481-484.
- Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G. F., Lambert, W., Van Der Straeten, D. (2007). "Folate fortification of rice by metabolic engineering." *Nature Biotechnology* 25(11): 1277-1279.
- Su, N., Wan, X.-y., Zhai, H.-q., Wan, J.-m. (2008). "Progress and Prospect of Functional Rice Researches." *Agricultural Sciences in China* 7(1): 1-9.
- Sunil, L., Srinivas, P., Prasanth Kumar, P. K., Gopala Krishna, A. G. (2014). "Oryzanol as natural antioxidant for improving sunflower oil stability." *Journal of Food Science and Technology*: 1-9.
- Świeca, M., Baraniak, B. (2014). "Nutritional and antioxidant potential of lentil sprouts affected by elicitation with temperature stress." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(14): 3306-3313.
- Świeca, M., Surdyka, M., Gawlik-Dziki, U., Złotek, U., Baraniak, B. (2014). "Antioxidant potential of fresh and stored lentil sprouts affected by elicitation with temperature stresses." *International Journal of Food Science and Technology* 49(8): 1811-1817.

Tapia, J. C. (2012). Modelización hidrológica de un área experimental en la cuenca del Río Guayas en la producción de caudales y sedimentos Maestría, *Universidad Nacional de La Plata, Argentina*.

Ti, H., Zhang, R., Zhang, M., Li, Q., Wei, Z., Zhang, Y., Tang, X., Deng, Y., Liu, L., Ma, Y. (2014). "Dynamic changes in the free and bound phenolic compounds and antioxidant activity of brown rice at different germination stages." *Food Chemistry* 161(0): 337-344.

Tian, S., Nakamura, K., Kayahara, H. (2004). "Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(15): 4808-4813.

Tomasik, P., Horton, D. (2012). Chapter 2 - Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. H. Derek, Academic Press. Volume 68: 59-436.

Veluppillai, S., Nithyanantharajah, K., Vasantharuba, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V. (2009). "Biochemical Changes Associated with Germinating Rice Grains and Germination Improvement." *Rice Science* 16(3): 240-242.

Villegas, R., Liu, S., Gao, Y. T., Yang, G., Li, H., Zheng, W., Xiao, O. S. (2007). "Prospective study of dietary carbohydrates, glycemic index, glycemic load, and incidence of type 2 diabetes mellitus in middle-aged Chinese women." *Archives of Internal Medicine* 167(21): 2310-2316.

Wang, H.-Y., Qian, H., Yao, W.-R. (2011). "Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity." *Food Chemistry* 128(3): 573-584.

Wang, T., He, F., Chen, G. (2014). "Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review." *Journal of Functional Foods* 7(0): 101-111.

Wang, W.-Q., Liu, S.-J., Song, S.-Q., Møller, I. M. (2015). "Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor." *Plant Physiology and Biochemistry* 86(0): 1-15.

Wang, W., Guo, J., Zhang, J., Peng, J., Liu, T., Xin, Z. (2015). "Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran." *Food Chemistry* 171(0): 40-49.

Watanabe, M., Maeda, T., Tsukahara, K., Kayahara, H., Morita, N. (2004). "Application of pregerminated brown rice for breadmaking." *Cereal Chemistry* 81(4): 450-455.

Watcharaparpaiboon, W., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O. (2010). "An improved process for high quality and nutrition of brown rice production." *Food Science and Technology International* 16(2): 147-158.

Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Woolfrey, B., Kritchevsky, D. (2007). "Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters." *Journal of Nutritional Biochemistry* 18(2): 105-112.

Williams, P. N., Lombi, E., Sun, G. X., Scheckel, K., Zhu, Y. G., Feng, X., Zhu, J., Carey, A. M., Adomako, E., Lawgali, Y., Deacon, C., Meharg, A. A. (2009). "Selenium characterization in the global rice supply chain." *Environmental Science and Technology* 43(15): 6024-6030.

- Wrigley, C. W. (2010). 2 - Cereal-grain morphology and composition. *Cereal Grains*. C. W. Wrigley and I. L. Batey, Woodhead Publishing: 24-44.
- Wu, F., Chen, H., Yang, N., Wang, J., Duan, X., Jin, Z., Xu, X. (2013). "Effect of germination time on physicochemical properties of brown rice flour and starch from different rice cultivars." *Journal of Cereal Science* 58(2): 263-271.
- Wu, F., Yang, N., Chen, H., Jin, Z., Xu, X. (2011). "Effect of Germination on Flavor Volatiles of Cooked Brown Rice." *Cereal Chemistry Journal* 88(5): 497-503.
- Wu, F., Yang, N., Touré, A., Jin, Z., Xu, X. (2012). "Germinated Brown Rice and Its Role in Human Health." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(5): 451-463.
- Xu, J., Zhang, H., Guo, X., Qian, H. (2012). "The impact of germination on the characteristics of brown rice flour and starch." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(2): 380-387.
- Yamagishi, T., Yamaguchi, A., Saito, T., Seguchi, M. (2008). "Complement-modulating water-soluble polysaccharide fractions in two global staple cereals: Rice and wheat." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(5): 805-812.
- Yan, Q.-J., Huang, L.-H., Sun, Q., Jiang, Z.-Q., Wu, X. (2015). "Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases." *Food Chemistry* 179(0): 290-295.
- Yang, C. Z., Shu, X. L., Zhang, L. L., Wang, X. Y., Zhao, H. J., Ma, C. X., Wu, D. X. (2005). "Starch Properties of Mutant Rice High in Resistant Starch." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(2): 523-528.
- Yang, F., Basu, T. K., Ooraikul, B. (2001). "Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52(4): 319-330.
- Yang, L., Kadowaki, M. (2009). "Effects of rice proteins from two cultivars, Koshihikari and shunyo, on hepatic cholesterol secretion by isolated perfused livers of rats fed cholesterol-enriched diets." *Annals of Nutrition and Metabolism* 54(4): 283-290.
- Yang, R., Yin, Y., Guo, Q., Gu, Z. (2013). "Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba* L.)." *Food Chemistry* 138(2–3): 1945-1951.
- Yean, J. N., Seok, H. N., Mi, Y. K. (2008). "Cholesterol-lowering efficacy of unrefined bran oil from the pigmented black rice (*Oryza sativa* L cv. Suwon 415) in hypercholesterolemic rats." *Food Science and Biotechnology* 17(3): 457-463.
- Yoshida, S. (1981). Fundamentals of rice crop science.
- Yu, L. L. S., Fereidoon Tsao, Rong (2012). Cereals and Pulses : Nutraceutical Properties and Health Benefits. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons.
- Zha, X. Q., Wang, J. H., Yang, X. F., Liang, H., Zhao, L. L., Bao, S. H., Luo, J. P., Xu, Y. Y., Zhou, B. B. (2009). "Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran." *Carbohydrate Polymers* 78(3): 570-575.

Zhang, G., Malik, V. S., Pan, A., Kumar, S., Holmes, M. D., Spiegelman, D., Lin, X., Hu, F. B. (2010). "Substituting Brown Rice for White Rice to Lower Diabetes Risk: A Focus-Group Study in Chinese Adults." *Journal of the American Dietetic Association* 110(8): 1216-1221.

Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X., Yao, H. (2009). "Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: Identification of the active peptide." *European Food Research and Technology* 229(4): 709-719.

Zhang, Q., Xiang, J., Zhang, L., Zhu, X., Evers, J., van der Werf, W., Duan, L. (2014). "Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice." *Journal of Functional Foods* 10(0): 283-291.

Zhang, Y., Wong, W.-T., Yung, K.-F. (2013). "One-step production of biodiesel from rice bran oil catalyzed by chlorosulfonic acid modified zirconia via simultaneous esterification and transesterification." *Bioresource Technology* 147(0): 59-64.

Zhou, Z., Chen, X., Zhang, M., Blanchard, C. (2014). "Phenolics, flavonoids, proanthocyanidin and antioxidant activity of brown rice with different pericarp colors following storage." *Journal of Stored Products Research* 59(0): 120-125.

Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., Blanchard, C. (2002). "Composition and functional properties of rice." *International Journal of Food Science & Technology* 37(8): 849-868.

Žilić, S., Basić, Z., Hadži-Tašković Šukalović, V., Maksimović, V., Janković, M., Filipović, M. (2014). "Can the sprouting process applied to wheat improve the contents of vitamins and phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour?" *International Journal of Food Science & Technology* 49(4): 1040-1047.